

Université de Sherbrooke

Développement d'un protocole d'extraction et de détection des
principaux pathogènes majeurs causant la mammite chez le bovin laitier

Par

Bertrand Cressier

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.) en Biochimie

27 août 2010

Évaluateurs

Dre. Nathalie Bissonnette (Département de Biochimie)

Dr. Eric Massé (Département de Biochimie)

Dr. François Malouin (Département de Biologie, Université de Sherbrooke)



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-83763-4

Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-83763-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Université de Sherbrooke

Développement d'un protocole d'extraction et de détection des principaux pathogènes majeurs causant la mammite chez le bovin laitier

Par Bertrand Cressier
Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M. Sc.) en Biochimie

27 août 2010

Évaluateurs

Dre. Nathalie Bissonnette (Département de Biochimie)

Dr. Eric Massé (Département de Biochimie)

Dr. François Malouin (Département de Biologie, Université de Sherbrooke)

RÉSUMÉ

Malgré des années de recherche, la mammite est encore la maladie qui engendre le plus de pertes pour les producteurs agricoles du secteur laitier. Il est possible que ce fait puisse s'expliquer en partie par l'effort important investi au niveau de l'amélioration génétique des vaches laitières de manière à favoriser des phénotypes permettant une production supérieure. Cette pression génétique s'est effectuée au détriment de la santé de celles-ci. Afin de corriger cette erreur, des technologies plus récentes sont donc appelées à être mises à contribution. L'identification et la caractérisation des différents microorganismes responsables de cette maladie sont des bonnes étapes vers la possibilité de mieux traiter les animaux atteints et de diminuer l'incidence des infections. L'utilisation de méthodes de détection moléculaires de ces pathogènes amène d'ores et déjà une capacité de diagnostic et un débit d'obtention de résultats difficilement atteignable à l'aide des méthodes d'identification microbiologiques seules, et ce, dans plusieurs domaines. Le secteur agroalimentaire n'y échappe pas et des méthodes de détection moléculaires des pathogènes causant des infections intramammaires menant à la mammite sont disponibles. Toutefois, il est important d'analyser les forces et les faiblesses des systèmes proposés actuellement de manière à évaluer leur utilité dans un cadre pratique pour l'industrie laitière. Le but du travail présenté est de proposer une méthode de détection des pathogènes causant des infections intramammaires en utilisant une approche moléculaire. De plus, celle-ci devait respecter plusieurs critères pré-établis qui sont, selon notre avis, nécessaires pour mettre au point un système qui puisse être vraiment utilisé dans un cadre appliqué. Ainsi, l'approche proposée permet d'identifier tous les pathogènes majeurs responsables de cas de mammite au Canada tout en ayant un coût d'opération raisonnable, une capacité de travail à haut débit automatisé et une sensibilité suffisamment élevée pour être utilisée avec des échantillons de lait. La méthode ainsi développée pour respecter ces critères a permis l'analyse de 273 échantillons de lait provenant de cas de mammite en utilisant une amplification PCR avec amorces fluorescentes suivie d'une électrophorèse capillaire et d'une analyse de fragments assistée par laser. Afin d'évaluer sa validité, les mêmes échantillons ont été analysés préalablement par les méthodes de microbiologie préconisées par le « National Mastitis Council », et ce, dans deux laboratoires indépendants. La méthode fut également validée à l'aide d'échantillons de lait contaminés artificiellement avec une quantité connue de chacun des microorganismes ciblés dans cette étude. Les résultats ont permis de déterminer les paramètres de sensibilité et de spécificité en comparant les résultats moléculaires avec ceux obtenus par les méthodes microbiologiques. Ces paramètres, bien qu'étant essentiels pour juger de la performance d'un outil de diagnostic moléculaire, sont trop souvent ignorés dans les études présentant de telles méthodes. Les travaux présentés sont donc à la fois prometteurs pour le diagnostic rapide de la mammite que pour la possibilité de mettre au point des marqueurs génétiques de résistance à la mammite dans le futur.

Mots clés : mammite, réaction en chaîne par polymérase en multiplex, diagnostic moléculaire, sensibilité, haut débit

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.	I
Liste des illustrations.	III
Liste des Figures.	III
Liste des Tableaux.	IV
Liste des abréviations.	V
Résumé	
INTRODUCTION.	1
1. Mammite.	1
1.1 Impact économique 2	2
2. Pathogènes causant la mammite. 3	3
2.1 Pathogènes contagieux 6	6
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> 6	6
2.1.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> 8	8
2.1.3 <i>Mycoplasma bovis</i> 9	9
2.1.4 Famille des <i>Staphylococci</i> à coagulase négative 10	10
2.2 Pathogènes environnementaux 11	11
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> 12	12
2.2.2 <i>Streptococcus uberis</i> et <i>Strep. dysgalactiae</i> 13	13
2.2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>K. oxytoca</i> 15	15
3. État actuel de l'industrie laitière québécoise 16	16
3.1 Analyse du lait 17	17

3.2 Traitement de la mammite.....	18
4. Identification microbiologique des pathogènes	20
5. Identification moléculaire des pathogènes	24
5.1 Isolement de l'ADN génomique bactérien	25
5.1.1 Enrichissement	26
5.1.2 Procédures d'extraction	27
5.2 Amplification et détection de l'ADN génomique	31
5.2.1 Méthodes d'amplification.....	32
5.3 Méthodes proposées de détection de la mammite	34
Avant-propos de l'article	40
Résumé de l'article	41
L'article scientifique	44
Abstract	46
Introduction	47
Materials and methods	50
Results	59
Discussion	75
Acknowledgements	82
Appendix	84
Discussion et conclusion	89
Remerciements	96
Liste des références	97

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution des trois principales causes de réforme involontaire des vaches laitières au Québec selon l'année.	18
Figure 2. Organigramme décisionnel utilisé pour l'identification microbiologique d'échantillons de lait provenant de cas de mammites.	22
Figure 3. Appariement des amorces et réaction de ligation caractéristique de la méthodologie LDR.	38
Figure 4. Hybridation du produit de LDR sur la micropuce via la séquence « zip code ».	39
Figure 5. Effect of lysostaphin treatment on detection of <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figure 6. Primer specificity assessment with positive and negative control species	63
Figure 7. Electrophoresis of multiplex PCR.....	64-65
Figure 8. Analytical sensitivity assessment of the protocol for the detection of all mastitis-causing pathogens except <i>Mycoplasma bovis</i> in spiked milk samples.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Proportion des espèces bactériennes retrouvées dans les échantillons de lait de diverses études étiologiques	5
Tableau 2. Caractéristiques d'études publiées visant à détecter des microorganismes dans le lait.....	29
Table 3. Cross-classification of the Chelex–PCR-based results obtained from the analysis of 153 single-infected milk samples	69
Table 4. Cross-classification of the Chelex–PCR-based results obtained from the analysis of 19 dual-infected milk samples.....	70
Table 5. Diagnostic sensitivity and specificity of the PCR-based analysis of clinical mastitis samples compared to microbiological detection.....	73
Supplementary Table 1. Primers and dyes used for multiplex PCR	84
Supplementary Table 2. Negative control species	86-87

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degrés Celsius

µg : microgramme

µL : microlitre

µM : micromolaire

AAFC : Agriculture and Agri-Food Canada

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

Arc. : *Arcanobacterium*

ARN : acide ribonucléique

ATCC : American type culture collection

AVC : Atlantic Veterinary College

BLAST : Basic local alignment search tool

CAMP : Christie, Atkins, Munch-Peterson (facteur)

CCS : Compte de cellules sommatiques

cfb gene : CAMP factor of serological group B *Streptococcus* gene

cfu: Colony-forming units

CHCl₂ : Chloroforme

CHUS: Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke

CNS : Famille des *Staphylococci* à coagulase négative (Coagulase negative

Staphylococci)

Coryn. : *Corynebacterium*

CTAB : bromure d'hexadécyltriméthylammonium (cetyl trimethyl ammonium bromide)

Cy3 : marqueur fluorescent cyanine-3 (cyanin-3)

DHI : Dairy herd improvement

DNA : Deoxyribonucleic acid

dNTP : désoxynucléotide triphosphate (deoxynucleoside triphosphate)

DTT : Dithiothréitol

dTTP : désoxythymidine triphosphate (deoxythymidine triphosphate)

dUTP : désoxyuridine triphosphate (deoxyuridine triphosphate)

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-linked immunosorbent assay)

g : constante d'accélération gravitationnelle terrestre

g : gramme

h : heure

IS900 : Séquence d'insertion 900 (Insertion sequence 900)

ISQ : Institut de la statistique du Québec

Kleb. ou *K.* : *Klebsiella*

kV : kilovolt

L : litre

LiPA : Line probe assay

M : molaire

MAP : *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

MAPAQ : Ministère de l'agriculture et des pêcheries du Québec

min : minute

MIO : milieu motilité-indole-ornithine (motility-indole-ornithin medium)

mL : millilitre

mM : millimolaire

m-PCR : Réaction en chaîne par polymérase multiplex

mRT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse multiplex

N/A : Non applicable

NMC : National mastitis council

P : valeur P statistique

PATLQ : Programme d'analyse des troupeaux laitiers du Québec

PBS : solution saline tamponnée au phosphate (phosphate buffered saline)

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)

PCR-LDR-UA : Polymerase chain reaction-ligation detection reaction-universal array

Pfu : *Pyrococcus furiosus*

pH : Unité de potentiel hydrogène

POP-4 : Performance optimized polymer-4

RFU : unités relatives de fluorescence (relative fluorescence units)

rRNA : ARN ribosomal (ribosomal RNA)

RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse

SAS : Statistical analysis system

SCC : Somatic cell count

SDS : Sodium dodécyl sulphate

SEA : Entérotoxine staphylococcale A (Staphylococcal enterotoxin A)

SEE : Entérotoxine staphylococcale E (Staphylococcal enterotoxin E)

spp. : Espèces (*species pluralis*)

Staph. : *Staphylococcus*

Strep. : *Streptococcus*

TAE : Tris-acétate EDTA (Tris-acetate EDTA)

Taq : *Thermophilus aquaticus*

Tris-HCl : 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride

TSA : Gélose trypticase de soja (Trypticase soy agar)

TSB : Bouillon de trypticase de soya (Trypticase soy broth)

TSST-1 : Toxine du syndrome du choc toxique de type 1 (Toxic shock syndrome toxin-1)

U : unité

ufc : Unités formatrices de colonies

UNG : uracile-N-glycosylase (uracil-DNA-glycosylase or uracil-N-glycosylase)

wt/vol : ratio de la masse divisé par le volume (weight volume ratio)

INTRODUCTION

1. Mammite

La mammite peut survenir chez tous les mammifères. Cette maladie a cependant suscité une attention particulière chez les bovins laitiers en raison de la mise en péril de la fonction principale de ces animaux d'élevage et de son incidence élevée. De façon générale, la mammite est définie comme une inflammation de la glande mammaire. Celle-ci est causée par une infection bactérienne dans la très grande majorité des cas bien que des infections par d'autres organismes ou un traumatisme physique tel qu'un choc peuvent également en être responsables.

Plusieurs symptômes caractérisent cette affection. La surface de la glande mammaire présente généralement des rougeurs et de l'enflure. Des symptômes généraux peuvent également subvenir dont de la fièvre, des pertes d'appétit, un abattement et la diarrhée. La composition physique et l'apparence macroscopique du lait produit par les vaches atteintes de mammite sont également très souvent altérées. Les modifications s'observent soit au niveau de la couleur qui peut varier de jaunâtre à rougeâtre ou par la présence de sédiments sous forme de flocons et de caillots.

Dans les cas les plus importants, la dégradation du tissu sécrétoire de la vache explique la coloration rouge du lait et les changements macroscopiques. Cependant, la majorité des symptômes moins graves sont causés par l'activation du système

immunitaire de l'animal atteint. De nombreuses cellules immunitaires se retrouvent dans la glande mammaire à tout moment dont les macrophages, les neutrophiles et les cellules « natural-killer » qui constituent la première barrière de défense immunitaire contre un pathogène. Lors de l'activation de la réponse immunitaire spécifique, il y a afflux de lymphocytes en plus d'autres neutrophiles et macrophages. Dans ce contexte, la quantité de cellules du système immunitaire dans la glande mammaire augmente dramatiquement, ce qui se reflète par le décompte de cellules somatiques (CCS) dans le lait puisque celui-ci passe alors de 50,000–200,000 cellules à plusieurs millions par millilitre de lait. La sécrétion lactée sera alors altérée de façon plus ou moins importante selon l'état général de l'animal. Ces observations font que le CCS est considéré comme un bon indicateur de l'état de santé de la glande mammaire (LACASSE, 2009) . Le développement de la mammite sera donc responsable de l'arrêt de la production laitière et l'envoi à la boucherie d'un certain pourcentage des animaux atteints, ce phénomène étant appelé la mise à la réforme. Alors que certains cas d'infections fulgurantes sont mortels, d'autres animaux seront réformés en raison de l'incapacité à traiter certains cas ou la volonté d'éliminer les risques de propagation de certains pathogènes à d'autres animaux du cheptel.

1.1. Impact économique

Les symptômes décrits précédemment font que cette maladie est largement la plus importante en termes de pertes de revenus pour l'industrie laitière. Une récente étude américaine évalue que les coûts moyens d'un cas de mammite sont de 179

dollars.(BAR *et al.*, 2008). Les pertes de revenu en raison du rejet de lait, les traitements vétérinaires associés, l'augmentation du risque de mortalité ainsi que la charge de travail supplémentaire pour le producteur sont les éléments qui justifient les pertes économiques directes associées à la mammite. En plus de ces pertes assumées par le producteur, la transformation du lait est également affectée par une baisse du rendement fromager lorsque le lait contient un CCS plus élevé (KLEI *et al.*, 1998). Finalement, la mammite aura également une influence sur la fertilité en diminuant la probabilité de conception de la vache atteinte, ce qui augmente le nombre d'insémination nécessaire à la conception et diminue le rendement laitier. Cette relation s'explique par le fait que la production laitière est optimale dans les premiers mois de la gestation, il est ainsi préférable que la vache soit gestante dès que possible. Ainsi, la proportion du nombre de jours en production laitière optimale par année est plus élevée. (AHMADZADEH *et al.*, 2009; HERTL *et al.*, 2010).

2. Pathogènes causant la mammite

Les cas de mammite sont causés en grande majorité par une infection bactérienne. Des infections causées par des levures ou des virus ont également été répertoriées (WELLENBERG *et al.*, 2002) mais ces cas sont principalement épisodiques. Pour ce qui est des bactéries, les pathogènes majeurs sont bien recensés dans la littérature. Plusieurs études décrivant l'étiologie d'échantillons de lait prélevés de vaches atteintes ont permis de caractériser rigoureusement les principaux pathogènes responsables de cette maladie. Le Tableau 1 présente un résumé des pathogènes

retrouvés dans les échantillons de lait au cours de ces études. Suite à ces observations, les différents pathogènes furent répartis en deux familles en se basant sur des critères de mode de propagation, soit les pathogènes contagieux et les pathogènes dits environnementaux.

Tableau 1. Proportion des espèces bactériennes retrouvées dans les échantillons de lait de diverses études étiologiques

Pays / Région	Année	Type d'étude	# Échantillons	Résultat d'identification microbiologique										Référence
				<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Strep. uberis</i>	CNS	<i>Kleb. spp.</i>	<i>Strep. dysgalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Arc. pyogenes</i>	<i>Coryn. bovis</i>	négatif	
Ontario	1993-1995	M	834	6,7	17,1*	14,0†	28,5	17,1*	14,0†	0,7	N/A	1,7	17,6	(SARGEANT <i>et al.</i> , 1998)
Wisconsin	1994-2001	M + L	83650	9,7	4,0	12,2†	13,2	1,2	12,2†	4,2	N/A	2,8	30,7	(MAKOVEC et RUEGG 2003)
Norvège	2000	L	14152	8,2	0,2	0,4	3,3	0,4	1,1	0,0	0,0	N/A	76,6	(OSTERAS <i>et al.</i> , 2006)
Belgique	2000-2002	L	178668	3,1	0,1*	2,7	9,7	0,1*	0,4	0,1	N/A	0,1	82,9	(PIEPERS <i>et al.</i> , 2007)
Italie	2000-2006	M	18771	20,6	2,9*	11,1†	22,6	2,9*	11,1†	2,3	N/A	N/A	47,4	(FERGUSON <i>et al.</i> , 2007)
Finlande	2001	L	12661	3,4	0,1*	0,7	16,6	0,1*	0,1	0,0	N/A	11,5	62,4	(PITKALA <i>et al.</i> , 2004)
Suède	2002-2003	M	1056	21,3	15,9	11,1	6,2	4,2	15,6	0,6	6,1	N/A	10,6	(ERICSSON UNNERSTAD <i>et al.</i> , 2009)
Canada	2003-2005	M	3033	10,3	8,4	6,3	5,1	4,3	4,0	0,1	1,2	0,2	43,9	(OLDE RIEKERINK <i>et al.</i> , 2008)
Angleterre	2004-2005	M	480	3,3	19,8	23,5	8,1	0,2	1,5	0,4	0,2	3,5	26,5	(BRADLEY <i>et al.</i> , 2007)
Allemagne	2005-2006	M	1325	10,7	11,5*	11,9	22,6	11,5*	10,4	0,4	4,6	N/A	20,5	(TENHAGEN <i>et al.</i> , 2009)
Canada	2007-2008	M	130000	17,8	7,5	7,5	2,3	1,3	7,9	N/A	N/A	N/A	29,4	(CHRISTEN 2009)

Deux types d'études ont été recensés selon la nature des échantillons de lait analysés, M : cas de mammites cliniques seulement ; L : échantillonnage du lait de toutes les vaches d'un troupeau. Le symbole * indique que dans ces études, seul le décompte des coliformes a été effectué sans différencier *E. coli*, *Kleb. spp.* ou d'autres espèces. Le symbole † indique que dans ces études, seul le décompte des *Streptococcus (Strep). non-agalactiae* a été effectué, sans différencier *Strep. uberis* de *Strep. dysgalactiae*.

2.1. Pathogènes contagieux

Cette sous-catégorie de pathogène se caractérise par son mode de transmission qui se produit entre les animaux par contact direct ou indirect via l'équipement de traite ou le manipulateur. La propagation aux animaux peut également provenir de la manipulation des trayons par l'humain lors de la traite. Effectivement, une certaine proportion des humains sont des porteurs sains de *Staphylococcus aureus*, dans ces cas, une relation commensale s'est établie entre le porteur et la bactérie qui se retrouve, entre autres, dans les fosses nasales (WILLIAMS 1963). Généralement, ces pathogènes ont la capacité de se multiplier après avoir infecté la glande mammaire. L'utilisation de méthodes de traite et de gestion strictes (désinfection des trayons, isolation ou réforme d'animaux infectés, bonne hygiène lors de la traite) contribuent largement à réduire l'incidence de ce type de mammite dans un troupeau laitier (HARMON 1996).

2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif de la famille des *Staphylococcaceae* en forme de coques. Il diffère des autres espèces du genre *Staphylococcus* par sa réaction positive au test de la coagulase. Il est fréquemment retrouvé sur la peau et les muqueuses de l'humain où il a une importance clinique puisqu'il peut causer un large spectre d'infection dont des infections de la peau, des

septicémies et le syndrome de choc toxique (KLUYTMANS *et al.*, 1997). Sa pathogénicité est associée à la production de toxines extracellulaires, les entérotoxines staphylococcales ainsi que la toxine TSST-1 (toxic shock syndrom toxin-1) (AKINEDEN *et al.*, 2001). Une diversité génétique existe parmi les entérotoxines staphylococcales, les gènes SEA à SEE désignent les plus connues bien que d'autres isoformes moins communes existent (BERGDOLL 1989).

S. aureus est sans aucun doute considéré comme le pathogène le plus important à l'heure actuelle parmi tous ceux pouvant engendrer des cas de mammite chez le bovin laitier. La fréquence à laquelle on retrouve ce pathogène dans les échantillons de lait de cas cliniques et sous-cliniques de mammite est généralement considérable, principalement depuis que d'autres bactéries sont beaucoup mieux contrôlées, notamment *Streptococcus* spp. L'émergence de souches résistantes à plusieurs antibiotiques couramment utilisés explique en grande partie sa prévalence élevée et la difficulté à traiter ces cas de mammite. Son incidence est également très cosmopolitaine; on le retrouve fréquemment dans du lait de cas de mammite peu importe la localisation géographique du troupeau laitier.

Il est considéré comme un pathogène contagieux puisque sa transmission n'est pas associée à l'exposition de la vache à l'environnement mais s'effectue principalement de vache à vache au moment de la traite, soit par l'équipement de traite utilisé ou par la personne manipulant les trayons. Il est responsable à la fois de cas de mammite cliniques, sous-cliniques et chroniques. Ces cas sont souvent difficiles à traiter en

raison de leur résistance aux antibiotiques. Effectivement, un certain pourcentage des souches infectant la glande mammaire sont résistants à des antibiotiques couramment utilisés comme la pénicilline, l'érythromycine ou la tétracycline (ERSKINE *et al.*, 2004).

2.1.2. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae est un *Streptococcus* de groupe B de Lancefield. Il est reconnu comme un pathogène obligatoire de la glande mammaire et c'est d'ailleurs ainsi qu'il a été initialement caractérisé (MCDONALD 1977), bien qu'il puisse également être retrouvé dans le tractus uro-génital chez la femme ainsi que le tractus gastro-intestinal chez tous les humains. Il ne peut cependant pas survivre dans l'environnement, à l'extérieur de son hôte. Chez l'humain, il est principalement inquiétant pour les femmes enceintes puisqu'il peut infecter le nouveau-né lors de la naissance et causer des pneumonies, des septicémies et des méningites (SCHUCHAT 1999). Il peut facilement être identifié en microbiologie en faisant le test du facteur CAMP (BROWN *et al.*, 1974) produit spécifiquement par le gène *cfb* chez cet organisme, (PODBIELSKI *et al.*, 1994) ce gène est d'ailleurs fréquemment utilisé pour l'identification moléculaire de cette espèce tel qu'il sera décrit plus loin.

Ce pathogène est très contagieux et les cas de mammites à *Streptococcus agalactiae* sont rapidement transmis à l'intérieur d'un troupeau si aucun traitement n'est effectué. Ces caractéristiques en faisaient un pathogène important jusque dans les années 1980 à 1990 dépendamment des pays. (KEEFE 1997) Cependant, des programmes de

contrôles de la mammite contagieuse, ciblant principalement de meilleures conditions d'hygiène ainsi que des changements au niveau des pratiques de gestion dont l'utilisation de désinfectant pour les trayons ont permis de diminuer largement l'incidence de ce pathogène dans les troupeaux (KEEFE 1997). De plus, il est susceptible à plusieurs antibiotiques, ce qui explique qu'il soit relativement peu commun dans les troupeaux des pays industrialisés depuis la fin des années 1990. Effectivement, une étude récente conduite à travers le Canada dénombre ce pathogène dans seulement 0,1% des cas de mammite testés (OLDE RIEKERINK *et al.* 2008) .

2.1.3. *Mycoplasma bovis*

Cet organisme est un des plus primitifs connu, faisant partie de la classe des *Mollicutes*. Il dépend entièrement de son hôte pour sa survie en raison de son incapacité à produire une partie des nutriments requis à sa croissance et qui explique l'absence des gènes associés à plusieurs voies métaboliques dans son génome. L'absence de paroi cellulaire à sa surface fait qu'il ne peut être soumis à la coloration de Gram. Bien que cette espèce ait été originalement identifiée chez les bovins, elle peut également infecter les moutons et les chèvres par exemple (PITCHER et NICHOLAS 2005).

En plus de la glande mammaire, ce pathogène se retrouve principalement dans les voies respiratoires supérieures, le tractus gastro-intestinal et les articulations. Il est également responsable de cas d'arthrite, d'otite, de pneumonie et de conjonctivite (HOULIHAN *et al.*, 2007). Il se transmet entre les animaux principalement par

échange de fluides muqueux (PITCHER et NICHOLAS 2005). Les craintes soulevées par rapport à ce pathogène dans les cas de mammite concernent la difficulté de l'éradiquer par l'utilisation d'antibiotiques et qu'il est extrêmement contagieux (JASPER 1982).

L'importance relative de *Mycoplasma bovis* comme agent causal de la mammite est mal défini et sujet à discussion. Puisque cet organisme possède une croissance très lente et laborieuse *in vitro*, des milieux et des conditions de croissance supplémentaires doivent être utilisés pour son isolement. Il n'est donc souvent pas décompté dans les études d'étiologie de la mammite. Il est ainsi difficile d'obtenir des statistiques précises sur le pourcentage d'échantillons de lait provenant de cas de mammite contenant ce pathogène. De plus, la présence d'un pathogène de la mammite dans un échantillon de lait cause fréquemment un arrêt des démarches pour déterminer si un mycoplasme pourrait y être retrouvé. Ces éléments mènent à penser que son incidence pourrait être plus élevée que ce qui est actuellement déterminé.

2.1.4. Famille des *Staphylococci* à coagulase négative

Cette famille de bactéries en forme de coques à Gram positif du genre *Staphylococcus* se caractérise par leur réaction négative au test biochimique de la coagulase. Ils sont des constituants normaux de la peau des humains et des animaux.

Considérées depuis toujours comme des bactéries ne pouvant qu'augmenter modérément le taux de SCC dans le lait sans causer d'inflammation, celles-ci semblent retenir de plus en plus l'attention. Ce sont maintenant les bactéries les plus souvent isolées d'échantillons de lait lors d'études étiologiques. De plus, ces bactéries sont souvent impliquées dans les infections intra mammaire chez les animaux n'ayant pas encore franchi le stade de la première lactation (DE VLIEGHER *et al.*, 2009). Leur capacité à infecter la glande mammaire ou générer une réaction immunitaire sans infection préalable est cependant discutée. Le nombre important d'espèces faisant partie de ce genre et l'hétérogénéité de leur capacité infectieuse partage l'opinion scientifique. En effet, ils sont parfois considérés au même titre que les pathogènes majeurs les plus connus (TAPONEN et PYORALA 2009) ou encore comme des espèces permettant de protéger la glande mammaire contre d'autres pathogènes. (PIEPERS *et al.*, 2010) Une étude récente a permis de démontrer que des souches de ces bactéries isolées d'infections intra-mammaires transportent parfois des gènes codant pour des entérotoxines staphylococcales. (PARK *et al.*, 2010)

2.2. Pathogènes environnementaux

Cette catégorie de pathogène comprend tous ceux dont le réservoir naturel se retrouve dans l'environnement de la vache ce qui n'exclut pas une propagation de vache en vache. Les facteurs de risques augmentant l'incidence de ce type de mammite sont la malpropreté de l'environnement de la vache, les saisons plus chaudes et l'utilisation de matériel organique en tant que litière.

2.2.1. *Escherichia coli*

Cette bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae* en forme de bâtonnets à Gram négatif est normalement retrouvée dans la flore intestinale des ruminants où elle ne cause pas d'infection. Cependant, de nombreuses souches pathogéniques ayant acquis divers facteurs de virulence ont été identifiées. Chez l'humain, le tractus gastro-intestinal est le principal site d'infection mais des souches spécifiques peuvent également causer des néphrites, des cystites, des méningites et des septicémies (CROXEN et FINLAY 2010). De ces souches, la plus connue est sans aucun doute O157:H7 qui a la capacité de produire des entérotoxines via un plasmide. Cette souche cause de nombreuses infections liées à la consommation de viande ou de produits laitiers non pasteurisés contaminés par des fèces.

E. coli infecte probablement la glande mammaire par l'exposition de celle-ci aux matières fécales, soit de façon directe où lors de la traite suite à un nettoyage insuffisant des trayons. Son mécanisme de pathogenèse est principalement attribué à la diffusion d'endotoxines dont les lipopolysaccharides relâchés au moment de la mort de la bactérie. L'infection intra mammaire est généralement de courte durée mais les symptômes peuvent être aigus si le pathogène n'est pas éliminé rapidement par le système immunitaire de la vache atteinte. Les souches isolées de cas de mammites présentent une large variété génotypique, tant au niveau de la présence ou l'absence des facteurs de virulence exprimés que dans leur capacité à causer des infections transitoires ou persistantes. Il semble donc que le génotype de l'espèce causant une

infection intramammaire n'ait pas un effet déterminant sur la sévérité des symptômes (DOGAN *et al.*, 2006; WENZ *et al.*, 2006).

2.2.2. *Streptococcus uberis* et *Strep. dysgalactiae*

Ces deux espèces de la famille des *Streptococcaceae* se présentent sous forme de coques à Gram positif. Ils sont généralement identifiés par leur réaction négative au test de la catalase, qui fait intervenir une enzyme requise pour la métabolisation de différents sucres ou par l'identification moléculaire du gène responsable de cette activité. On les distingue biochimiquement de *Streptococcus agalactiae* par leur réaction négative au test du facteur CAMP. Puisque ces espèces sont généralement hémolytiques, un test sérologique peut être utilisé pour les différencier. Cependant, contrairement à *Streptococcus agalactiae*, cette caractéristique seule est largement insuffisante pour caractériser *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis*. La première espèce faisant partie du groupe C de Lancefield, la seconde génère un résultat variable ce qui en fait un critère peu utilisé pour leur classification (WATTS 1988; FACKLAM 2002).

Bien que ces deux espèces soient souvent classées dans le même groupe lors d'études étiologiques sur des échantillons de lait, *Streptococcus uberis* est généralement beaucoup plus fréquemment rencontré dans les cas de mammite que *Streptococcus dysgalactiae*.

Ces espèces sont considérées comme étant des pathogènes environnementaux puisqu'ils sont retrouvés dans différents foyers d'infection faisant partie de l'environnement des bovins, notamment le fumier et la litière en plus de différents sites sur les animaux eux-mêmes. De plus, des infections surviennent fréquemment chez les vaches qui ne sont pas en contact avec le système de traite, mettant en évidence l'aspect environnemental de l'infection. Cependant, ces pathogènes semblent posséder la capacité de se transmettre également par contagion. Les cas de mammites peuvent être cliniques et sous-cliniques tout en ayant une durée variable. La pathogénèse de ces deux espèces est plutôt mal connue; il n'y a pas de production évidente de toxines comme pour d'autres pathogènes de la glande mammaire. Des activateurs du plasminogène bovin produit par *Streptococcus uberis* sont cependant des facteurs de virulence potentiels. Bien qu'il n'y ait pas d'évidences *in vivo* pour appuyer cette hypothèse, ces protéines permettraient d'activer l'invasion bactérienne dans la glande mammaire hôte; c'est-à-dire de favoriser leur croissance et l'acquisition d'éléments nutritifs tels que des acides aminés (LEIGH 1999; ZADOKS *et al.*, 2003).

La pathogénèse de *Streptococcus dysgalactiae* est encore moins bien connue, seules quelques caractéristiques qui pourraient expliquer sa capacité infectieuse ont été mises en évidence. Cette bactérie pourrait se lier à plusieurs protéines du système immunitaire dont les immunoglobulines de type G, le collagène et la fibronectine. Elle produirait également des facteurs ayant des activités favorisant sa pathogénécité, par

exemple : l'hyaluronidase, la fibrinolysine et d'autres favorisant l'adhérence cellulaire (CALVINHO *et al.*, 1998).

2.2.3. *Klebsiella pneumoniae* et *K. oxytoca*

Ces bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* se retrouvent sous forme de bâtonnets à Gram négatif. Elles sont regroupées en une seule catégorie en raison de leur forte proximité phylogénétique en plus de la similarité des symptômes causés dans les cas de mammites. Leur différenciation microbiologique et biochimique se fait principalement encore en utilisant un test de dégradation de l'indole produit à partir de tryptophanase même si un test moléculaire est disponible à cette fin (KOVTONOVYCH *et al.*, 2003). Le genre *Klebsiella*, bien qu'étant à l'origine connu comme agent causal de pneumonies, est principalement associé à des infections nosocomiales dont des infections urinaires et des septicémies (PODSCHUN et ULLMANN 1998). Dans tous les contextes d'infection par des espèces de ce genre, *K. pneumoniae* est largement plus répandu que *K. oxytoca*.

Ce pathogène opportuniste est retrouvé autant dans la nature que dans le tractus gastro-intestinal et les muqueuses de mammifères. Ceci explique que dans le contexte de la ferme laitière, l'utilisation de litière contenant des produits organiques comme la paille et la paille a été identifié comme un foyer favorisant l'infection et permettant la propagation de la mammité à *Klebsiella* spp. (MUNOZ *et al.*, 2007). Bien que cette espèce ne représente pas une proportion importante des pathogènes retrouvés lors de

cas de mammite, son importance n'est pas négligeable puisque ces infections sont généralement plus difficile à traiter, ont une durée plus grande et causent parfois des mammites suraigües dont le taux de mortalité est élevé (HOGAN *et al.*, 1989). Ces symptômes sont généralement associés aux facteurs de virulence de cette espèce dont la production de lipopolysaccharides et d'adhésines ainsi que sa résistance aux antibiotiques médiée par des plasmides (PODSCHUN et ULLMANN 1998).

3. État actuel de l'industrie laitière québécoise

L'industrie laitière représente une part de marché importante des activités agricoles canadiennes et c'est encore plus vrai au Québec. La valeur de la production totale de lait au Québec en 2008 est de 1953 milliards de dollars, ce qui est presque autant que la valeur de la production végétale totale québécoise (Source : Profil sectoriel de l'industrie bioalimentaire au Québec, Édition 2009, MAPAQ et ISQ). Les fermes laitières québécoises se caractérisent par des troupeaux plus petits que toutes les autres provinces canadiennes. Le nombre moyen de vaches par troupeau pour le Québec, l'Ontario et la Colombie-Britannique étant respectivement de 51,5 ; 62,2 ; 112,4 en 2004. Malgré cela, le Québec est la province produisant le plus de lait au Canada avec une production de 2,764 milliards de litres en 2007 (Source : La production laitière au Québec en 2010 défis et solutions, MAPAQ).

3.1. Analyse du lait

Les fermes laitières québécoises sont supervisées depuis 1970 par le PATLQ (Programme d'analyse des troupeaux laitiers du Québec). En 2006, l'organisme VALACTA a été créé pour le remplacer, celui-ci est une propriété de la Fédération des producteurs laitiers du Québec, du Ministère de l'agriculture et des pêcheries du Québec ainsi que de l'Université McGill. Son rôle est de constamment promouvoir le développement de l'industrie laitière québécoise en offrant des services appropriés aux producteurs laitiers dans des champs divers tels que la gestion, la génétique, les finances, l'alimentation, la recherche et le développement ainsi que les traitements vétérinaires (site Internet de VALACTA, <http://www.valacta.com>). Au 31 décembre 2008, 5329 troupeaux laitiers québécois y étaient inscrits sur les 6982 présents au Québec (Source : Le Producteur de Lait Québécois, Évolution de la production laitière québécoise 2008, p. 12, mai 2009). Il est à noter qu'un organisme similaire, CanWest DHI, remplit un mandat similaire dans toutes les provinces canadiennes à l'ouest du Québec (site Internet de CanWest DHI, <http://www.canwestdhi.com>). Les troupeaux inscrits bénéficient de l'analyse d'échantillons de lait à des fins de gestion tels que le décompte de cellules somatiques ainsi que la concentration de gras, de protéines et de lactose. De plus, les analyses effectuées servent officiellement au paiement du lait, qui se fait par kilogramme de matières grasses. Le CCS, quant à lui, engendre des pénalités financières si le taux dépasse 500,000 cellules / mL de lait tandis qu'un enfreint répété de cette limite engendre une suspension de la collecte. Ces directives sont décrites dans la Convention de la mise en marché du lait, un document servant

d'entente entre la Fédération des producteurs de lait du Québec et le Conseil de l'industrie laitière du Québec.

Des efforts sont constamment fournis pour améliorer la qualité du lait produit ainsi que les caractéristiques de santé de la vache, particulièrement au Québec. En effet, depuis longtemps, le Québec a le plus haut taux de compte de cellules somatiques par mL de lait parmi toutes les provinces canadiennes. En 2004, le décompte moyen était de 267,000 par mL soit près de 5% de plus que l'Ontario qui possède pourtant des types d'élevage relativement semblable (Source : La production laitière au Québec en 2010 défis et solutions, MAPAQ). Compte tenu qu'un faible taux de CCS est la meilleure indication d'une bonne santé de la glande mammaire, cette statistique met donc en lumière des lacunes concernant ce domaine dans les troupeaux québécois.

3.2. Traitement de la mammite

En 2008, la mammite était la raison de la réforme involontaire de 14,25% des vaches, un pourcentage en constante augmentation depuis 1980 (Figure 1).

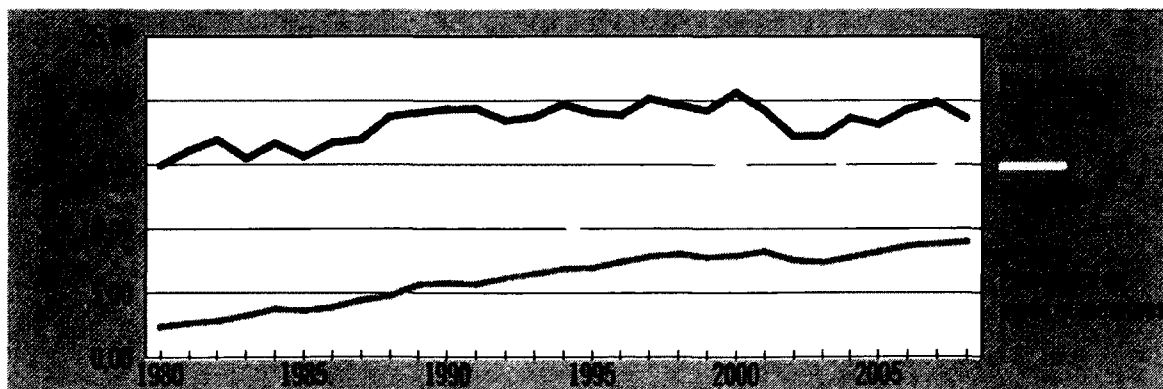


Figure 1. Évolution des trois principales causes de réforme involontaire des vaches laitières au Québec selon l'année. Figure tirée de DUROCHER et MARTIN 2009

La réforme est l'action de cesser d'utiliser une vache à des fins de production laitière et, généralement, de la vendre à un abattoir. Celle-ci a généralement lieu après de nombreux cycles de lactation et lorsque la production laitière faiblit à un niveau qui ne justifie pas de conserver l'animal dans le cheptel. Lorsqu'elle est involontaire, la réforme se produit prématurément en raison d'un problème de santé suffisamment important pour justifier l'arrêt de l'exploitation du potentiel laitier de la vache.

À l'heure actuelle, le principal outil utilisé pour identifier un cas de mammite sous-clinique est le décompte du nombre de cellules somatiques qui est disponible au producteur laitier suite à l'analyse mensuelle d'échantillons de lait des vaches de son troupeau. Lorsque des signes cliniques apparaissent, celui-ci fait appel au vétérinaire qui administre généralement un antibiotique à large spectre, tel que la pénicilline ou les céphalosporines, lorsqu'il juge la procédure nécessaire. L'échantillon de lait est prélevé par le vétérinaire traitant et sera expédié à un laboratoire d'analyse microbiologique. Le prélèvement d'échantillons de lait est utilisé suite à des cas cliniques ou des cas sous-cliniques récurrents mais sa fréquence d'utilisation dépend principalement de l'intérêt manifesté par le producteur laitier. En résumé, malgré l'éventail des techniques de diagnostic de la mammite disponibles, peu d'entre elles sont utilisées concrètement dans les troupeaux laitiers québécois.

Les cas de mammite chronique se caractérisent par une excrétion transitoire du pathogène dans le lait et des signes cliniques généralement ambigus. Cependant, cela ne veut pas dire que leur influence est négligeable puisqu'ils causent tout de même une baisse de la production laitière et constituent un risque continu de propagation aux autres animaux. Parmi les mesures pouvant être utilisées pour contrer ce type de mammite dans les troupeaux, la prévention s'avère particulièrement importante. Les plus efficaces concernent le maintien d'une bonne hygiène et de la propreté, par exemple, une désinfection efficace des trayons avant et après la traite ainsi que l'entretien du matériel de traite. Les traitements lors du tarissement aident également grandement à éviter les infections lors de cette période à risque plus élevé. Les cas de mammites cliniques, quant à eux, doivent être traités promptement. Tel que mentionné, l'administration d'antibiotiques est l'élément principal du traitement mais l'utilisation d'anti-inflammatoires est également conseillée (site Internet du Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine, <http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/fr/page.php?p=10&tm=h&niv=1>).

4. Identification microbiologique des pathogènes

La détection des bactéries responsables des infections intramammaires s'est développée au courant du vingtième siècle. La capacité de faire croître les micro-organismes présents dans le lait sur un milieu de culture permet d'isoler et d'identifier le pathogène causant l'infection en se basant sur différents critères spécifiques. Ces méthodes se sont développées par l'entremise de l'utilisation de milieux sélectifs et

différentiels ainsi qu'à l'aide de tests biochimiques qui permettent de caractériser les bactéries par leur expression phénotypique sur ces milieux. L'optimisation de l'ensemble de ces méthodes a permis à l'organisation National Mastitis Council d'émettre un guide de référence, largement utilisé, permettant d'avoir consensus concernant l'utilisation des méthodes de diagnostics microbiologiques pour la détection des pathogènes causant des infections intramammaires menant à la mammite (NATIONAL MASTITIS COUNCIL 2004). Le processus décisionnel adopté se base sur un organigramme décisionnel (Figure 2) permettant de procéder successivement aux tests adéquats en fonction des résultats obtenus initialement sur une gélose contenant 5% de sang de mouton défibriné et 1g/L d'esculine en plus des éléments nutritifs de base habituellement utilisés. Ce milieu permet d'identifier le type d'hémolyse produit par le microorganisme, s'il y a lieu, en plus de ces aspects morphologiques. L'utilisation de ces méthodes a permis de mieux cibler l'antibiothérapie à utiliser et de donner des directives spécifiques tel que la quarantaine ou la mise à la réforme des animaux atteints de pathogènes contagieux. Cependant, certains aspects de cette méthodologie comportent des lacunes importantes.

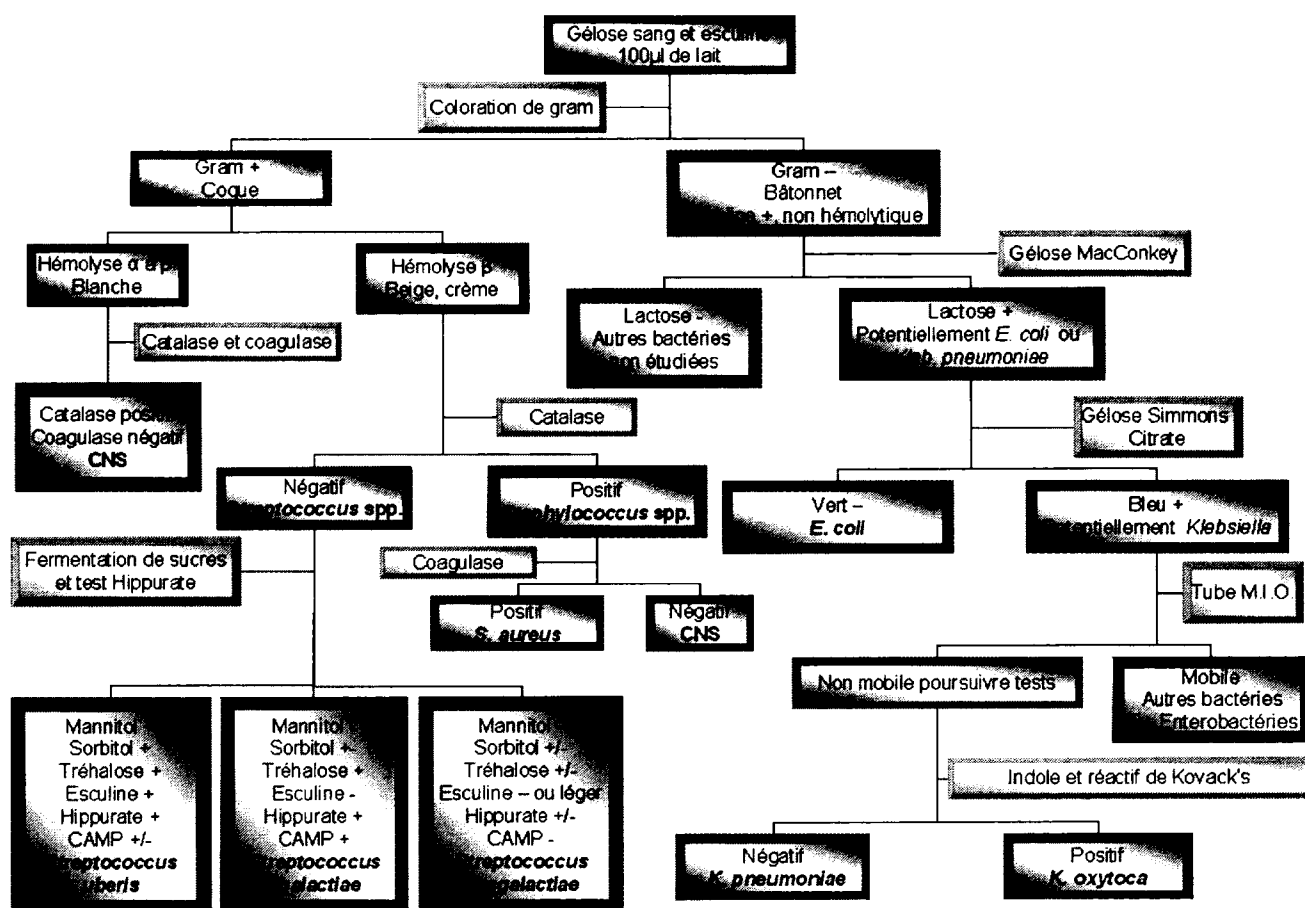


Figure 2. Organigramme décisionnel utilisé pour l'identification microbiologique d'échantillons de lait provenant de cas de mammites. Les encadrés verts représentent les milieux sélectifs et les tests biochimiques utilisés. L'interprétation des résultats est décrite dans les encadrés bleus (Figure fournie par Ruth Zadoks, Department of Food Science and Quality Milk Production Services, Cornell University, Ithaca, NY).

Pour commencer, l'obtention de résultats faussement négatifs nuit grandement à la caractérisation d'une certaine proportion des cas de mammites. En effet, comme il est possible de le constater par les données présentées dans le Tableau 1, une proportion variant de 10 à 43% des échantillons prélevés de vaches présentant un cas clinique de

mammite génèrent un résultat négatif par culture microbiologique. Ces résultats sont surprenants puisque le seuil de détection théorique de la culture bactériologique du lait est 100 UFC/mL. Ce seuil de détection étant relativement sensible, il est peu probable que tous ces échantillons négatifs contiennent moins de 100 UFC/mL de pathogènes. Plusieurs propositions ont donc été faites pour expliquer ces résultats. L'hypothèse de la mort ou l'incapacité de croître des bactéries causant des infections intramammaires a été avancée (TAPONEN *et al.*, 2009). Ces résultats faussement négatifs pourraient être causés par l'utilisation d'antibiotiques préalablement au prélèvement, à la présence de composés inhibant la croissance dans le lait ou à la production, par d'autres microorganismes, de composés inhibiteurs dans les cas d'infections croisées. De plus, le système immunitaire de l'hôte peut avoir affecté la viabilité d'un microorganisme efficacement mais celui pourrait maintenir le statut d'inflammation par la libération de toxines (TAPONEN *et al.* 2009; KRÖMKER *et al.*, 2010).

Les délais requis pour l'obtention des résultats de caractérisation microbiologique sont également un défaut majeur de cette approche, particulièrement pour certaines espèces bactériennes dont la croissance sur milieu sélectif est fastidieuse comme *Mycoplasma bovis*. Puisqu'une période de croissance de plus d'une semaine est typiquement nécessaire pour l'identification de ce microorganisme, les laboratoires microbiologiques ne font pas de tests routiniers pour sa détection dans les échantillons de lait. Le test est complémentaire et s'effectue seulement à la demande spécifique du producteur ou du vétérinaire. De plus, il est important que l'échantillon soit expédié

au laboratoire d'analyse rapidement (moins de 48 heures) pour s'assurer de la survie de *Mycoplasma* spp. (Site internet du MAPAQ, http://www.mapaq.gouv.qc.ca/NR/rdonlyres/A5762FCA-CCAB-48A9-A83E-48C686BC6878/0/Grille2010_finale.pdf).

Finalement, l'analyse microbiologique conventionnelle pour le diagnostique des cas de mammite est d'autant plus compliquée par le fait que les résultats de croissance sur les géloses ainsi que l'analyse des tests biochimiques sont sujet à interprétation. Celle-ci peut être causée par un biais lié à la nature de l'expérimentateur qui interprète ces tests, certains critères étant subjectifs (WEESE et PRESCOTT 2009). De plus, certains résultats de tests biochimiques ou plusieurs caractéristiques de croissance couramment utilisés pour l'identification des pathogènes comportent un taux non négligeable de variation phénotypique pour plusieurs souches de la même espèce (RAPPAPORT *et al.*, 1988; FANTELLI et STEPHAN 2003).

5. Identification moléculaire des pathogènes

De nombreuses solutions ont été avancées pour remplacer ou amener un complément d'information au diagnostic microbiologique de la mammite. Des immunoessais de type ELISA (POUR YAZDANKHAH *et al.*, 1998), une caméra thermique (HOVINEN *et al.*, 2008), la détection d'enzymes indicatrices d'inflammation (HISS *et al.*, 2007), la conductivité électrique du lait (NORBERG 2005) et le dosage de métabolites volatiles (HETTINGA *et al.*, 2008) sont des méthodes qui ont été proposées pour la détection de la mammite. Cependant, aucune d'entre elles n'est appelée à devenir le

« gold standard » à court terme. Par contre, les technologies visant le matériel génétique pour la détection de microorganismes semblent beaucoup plus prometteuses tel qu'il sera possible de le constater dans cette section.

L'avènement des méthodes d'amplification de matériel génétique *in vitro* tel que le principe de la polymérisation par réaction en chaîne (MULLIS *et al.*, 1986) a permis le développement d'applications de diagnostic en tous genre. L'identification des pathogènes à l'origine de la mammites bovine n'y échappe pas, les méthodes d'identification moléculaires étant appelées à remplacer, ou du moins, à compléter la microbiologie classique.

En effet, les méthodes d'amplification moléculaire sont reconnues pour être rapides d'exécution, sensibles, spécifiques et opérationnelles à très haut débit. Ces critères prisés furent également retenus dans le contexte du travail présenté ici. Des adaptations de cette méthodologie seront donc présentées pour illustrer son potentiel.

5.1. Isolement de l'ADN génomique bactérien

Il est essentiel de purifier l'ADN de l'échantillon d'intérêt de manière à pouvoir l'amplifier et l'analyser efficacement par des méthodes moléculaires. Bien que cette étape soit facilement réalisable sur des échantillons provenant de cultures pures avec des organismes modèles en biologie moléculaire, elle nécessite beaucoup plus d'attention lorsqu'il est question d'isoler l'ADN bactérien présente dans un

échantillon de lait. En effet, ce milieu est très hétérogène; il est constitué de micelles protéiques formées de caséines maintenues par des ions calcium, des globules de gras, du lactose ainsi que d'autres protéines en suspension (FOX *et al.*, 1998). L'inhibition des réactions PCR par la présence de matériel biologique issu de l'échantillon initial est un phénomène connu (TICHOPAD *et al.*, 2004). On a cependant souligné le manque d'attention porté à cette étape soit nuisible aux applications moléculaires visant des échantillons de nature complexe (BREHM-STECHER *et al.*, 2009). Pour ce qui est du lait, cet effet est particulièrement marqué par la concentration élevée de calcium (1200 µg/mL) et la présence de la fraction grasse (BICKLEY *et al.*, 1996). Les différentes options pour séparer efficacement les microorganismes d'intérêt et isoler leur ADN génomique seront présentées.

5.1.1. Enrichissement

Une procédure couramment utilisée pour contourner les problèmes potentiels présentés précédemment et augmenter la concentration de bactéries présentes dans l'échantillon consiste à enrichir celui-ci. Cette méthode consiste à incuber l'échantillon de lait en présence d'un milieu de culture sélectif selon l'organisme cible que l'on veut enrichir pour en multiplier sa concentration. Bien que cette façon de faire ait été originalement développée pour l'identification microbiologique (THURMOND *et al.*, 1989), en procédant par la suite à l'extraction d'ADN génomique, les substances du lait ayant un potentiel inhibiteur de PCR seront diluées dans le milieu de culture qui n'en contient pas. Il en résulte une augmentation de la concentration de l'organisme cible et une diminution de l'inhibition du PCR. Cette

méthodologie a donc la capacité d'augmenter le seuil de détection des bactéries présentes dans l'échantillon de lait qu'il s'agisse d'agents causant des infections intramammaires (PHUEKTES *et al.*, 2001) ou des microorganismes contaminants qui présentent un danger pour la consommation humaine (OMICCIOLI *et al.*, 2009). Néanmoins, l'enrichissement peut causer un déséquilibre dans la concentration de pathogènes présents dans le lait lorsqu'il y a co-infection. Il est raisonnable de penser que la croissance d'un microorganisme peut inhiber celle d'un autre par compétition, masquant ainsi la vraie nature microbiologique de l'échantillon. Ce phénomène a d'ailleurs été observé dans plusieurs études dans lesquelles l'enrichissement est utilisé (DUNBAR *et al.*, 1997; BRUHN *et al.*, 2005).

5.1.2. Procédures d'extraction

Une des étapes les plus importantes pour le développement d'un outil de diagnostic moléculaire est sans aucun doute l'extraction du microorganisme à partir de l'échantillon dans lequel il se trouve. Cette étape doit être adaptée suivant la nature du tissu biologique. Le lait et les produits laitiers sont des exemples de tissus biologiques complexes. Puisqu'il n'existe pas de méthode universelle pour extraire l'ADN génomique d'une bactérie d'un échantillon de lait, de nombreuses publications présentent des solutions à ce problème (voir Tableau 2). La méthode d'extraction est en général adaptée selon les principaux critères fixés par les auteurs. Voici certains d'entre eux : le(s) microorganisme(s) à isoler, la limite de coût acceptable, le temps nécessaire pour effectuer l'ensemble des opérations d'extraction, l'utilisation de certains produits toxiques et la capacité de transfert vers une utilisation à haut débit.

Malgré la variété des procédures proposées, plusieurs étapes critiques de l'isolement de l'ADN, ainsi que les traitements qui y sont associés, peuvent être mises en valeur.

Tableau 2 : Caractéristiques d'études publiées visant à détecter des microorganismes dans le lait

Microorganismes détectés	Type d'échantillons de lait	Procédure(s) d'extraction ¹	Approche moléculaire	Limite de detection CFU/mL	Référence
<i>Staph. aureus</i> <i>Strep. uberis</i> <i>Strep. agalactiae</i> <i>Strep. dysgalactiae</i>	Contamination artificielle	Guanidine thiocyanate Triton X-100 DTT Billes de silice	PCR	10	(CREMONESI <i>et al.</i> , 2006)
<i>Staph. aureus</i>	Contamination artificielle	Triton X-100 Trypsine n-pentane NaOH	RT-PCR	1150	(GRABER <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. coli</i> <i>Shigella spp.</i>	Contamination artificielle et naturelle	Enrichissement Lysozyme Guanidine thiocyanate Sarcosyl Acétate d'ammonium Chloroforme	m-PCR	10	(RIYAZ-UL-HASSAN <i>et al.</i> , 2009)
<i>Staph. aureus</i>	Contamination artificielle et naturelle	SDS Pronase Lysozyme Lysostaphine Protéinase K	RT-PCR	10 théorique	(HEIN <i>et al.</i> , 2005)
Plupart des bactéries causant la mammite	Contamination artificielle et naturelle	Non-spécifié	PCR-LDR-UA	Non-spécifié	(CREMONESI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Staph. aureus</i> <i>Strep. uberis</i> <i>Strep. agalactiae</i>	Contamination artificielle et naturelle	SDS Pronase Lysozyme Lysostaphine Proteinase K	mRT-PCR	100 à 1000	(GILLESPIE et OLIVER 2005)
Plupart des bactéries causant la mammite	Contamination artificielle et naturelle	Kit commercial	mRT-PCR	2230	(TAPONEN <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. cremoris</i>	Contamination artificielle et naturelle	EDTA 0.5M Sucrose Lysozyme Mutanolysine RNase SDS Protéinase K Phénol-CHCl ₂ -alcool isoamylique	RT-PCR	200	(GRATTEPANCHE <i>et al.</i> , 2005)
<i>Brucella spp.</i>	Contamination artificielle	Lipase Trypsine Triton X-100 NaOH SDS Guanidium thiocyanate Phénol-CHCl ₂ -alcool isoamylique	Nested PCR LiPA	280	(RIJPENS <i>et al.</i> , 1996)
<i>Strep. agalactiae</i>	Contamination artificielle	Lysozyme Protéinase K	PCR	10000	(MEIRI-BENDEK <i>et al.</i> , 2002)

¹ Les termes rapportés dans cette colonne constituent les produits utilisés lors de la procédure d'extraction.

Toutes les procédures comportent inévitablement une étape de centrifugation pour former un culot composé de cellules somatiques, de protéines précipitées et de bactéries. Précédant cette étape, il est nécessaire de déstabiliser la fraction de gras et les micelles de caséines de façon à pouvoir les éliminer par décantation par la suite. Les composés chimiques utilisés à cette fin sont divers. Des chélateurs comme l'EDTA séquestrent les ions calcium et dénaturent les micelles de caséines (GRATTEPANCHE *et al.* 2005), des détergents ioniques solubilisent le gras et les protéines alors que des produits comme l'urée ou des agents chaotropiques tel que la guanidine thiocyanate dénaturent les protéines (ODUMERU *et al.*, 2001). Des enzymes sont également utilisées à cette fin, notamment la trypsine (GRABER *et al.* 2007), la pronase (HEIN *et al.* 2005), des lipases (RIJPENS *et al.* 1996) et la protéinase K (MEIRI-BENDEK *et al.* 2002).

Par la suite, la paroi cellulaire bactérienne est lysée par divers procédés pour libérer son matériel génétique. Le type de microorganisme impliqué est important puisque la susceptibilité de leur paroi cellulaire aux différents traitements diffère grandement. La lyse physique se fait soit en utilisant des billes de zirconium de faible dimension qui lysent la paroi cellulaire de n'importe quel organisme par agitation (ODUMERU *et al.* 2001), ou par une incubation à haute température (plus de 90°C). Des enzymes dégradant spécifiquement la paroi cellulaire peuvent être utilisées dont la lysostaphine (HEIN *et al.* 2005), la mutanolysine et le lysozyme (GRATTEPANCHE *et al.* 2005).

Finalement, les acides nucléiques libérés dans l'échantillon peuvent être purifiés afin de réduire l'effet inhibiteur de certains contaminants sur les applications moléculaires en aval. Les techniques habituelles de purification qui consistent à utiliser des solvants organiques suivi d'une précipitation des acides nucléiques sont fréquemment utilisées (RIYAZ-UL-HASSAN *et al.* 2009). La liaison de l'ADN à des billes de silice et son élution subséquente a été proposée (CREMONESI *et al.* 2006). Dans le même ordre d'idée, des systèmes de purification d'ADN commerciaux ont également été adaptés dans certains cas pour être utilisés à cette fin.

5.2. Amplification et détection de l'ADN génomique

La détection de régions spécifiques d'ADN génomique est une méthode très utilisée à l'heure actuelle pour identifier ou caractériser un organisme précis dans un échantillon donné. De tels outils ont la capacité d'atteindre des niveaux de sensibilité analytique très élevés. Cependant, il est très important de concevoir une méthodologie qui soit adéquate pour que le niveau de spécificité atteint soit convenable à son utilisation.

La détection de séquences ciblées d'ADN génomique est couramment utilisé pour deux applications distinctes. Premièrement, pour identifier l'espèce du pathogène en cause chez un sujet, comme dans le cas du travail présenté dans ce mémoire. Deuxièmement, cette approche est également utilisée pour caractériser l'espèce en cause. Effectivement, la détection de facteurs de virulence et de gènes de résistance

aux antibiotiques chez une souche pathogénique permet une caractérisation plus précise du microorganisme (SUNDSFJORD *et al.*, 2004). Ces stratégies sont évidemment applicables à la détection de la mammite bovine mais elles sont également très intéressantes pour des infections humaines de grande envergure causées par *Escherichia coli*, *Vibrio cholera* et *Clostridium botulinum*, par exemple (PFALLER *et al.*, 2001; VERSALOVIC et LUPSKI 2002).

5.2.1. Méthodes d'amplification

Le point de départ de l'identification moléculaire d'une espèce est de cibler une région de son génome dont la séquence est, dans le meilleur des cas, unique à celle-ci. Généralement, le choix de cette région génétique aura des conséquences très importantes sur la spécificité de la méthode de détection finale. En effet, un faible niveau de conservation de la région sélectionnée, utilisée pour discriminer l'espèce visée des autres espèces les plus rapprochées évolutivement, corrèlera avec un pouvoir de discrimination élevé du test. Le séquençage en masse des espèces bactériennes a d'ailleurs contribué considérablement au développement de ces techniques.

Pour les organismes les plus étudiés, les même gènes sont exploités pour leur détection spécifique puisqu'ils ont obtenu le statut de marqueurs fiables. Ainsi, des loci semblables sont amplifiés pour chacune de ces espèces et les différences de séquences rencontrées permettent d'identifier chacune d'entre elles. Par ailleurs, l'utilisation de gènes associés à un phénotype utilisé pour la caractérisation

microbiologique semble être une option idéale. Cette stratégie est utilisée dans le cas du gène *cfb*, codant pour le facteur CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) de *Streptococcus agalactiae* (KE *et al.*, 2000). Cette protéine extracellulaire est connue pour interagir avec les hémolysines β de *Staphylococcus aureus*, ce qui permet son identification microbiologique (WILKINSON 1977). Dans le cas d'organismes moins étudiés et dont le génome n'a pas été séquencé, des zones variables de gènes universels comme ceux de l'espace inter génique de l'ARN ribosomal 16S-23S peuvent être utilisées (HASSAN *et al.*, 2003). Des gènes de certains organismes sont parfois si spécifiques que leur utilisation à des fins d'identification est brevetée, ce qui est le cas de la séquence d'insertion IS900 de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (VARY *et al.*, 1990).

Cependant, la détection moléculaire directe d'une séquence définie dans le génome du pathogène n'est généralement pas adéquate, celle-ci représentant une infime portion du génome. On a souvent recours à l'amplification afin d'augmenter le nombre de copies de la région génétique d'intérêt préalablement à sa détection. À cette fin, de nombreuses méthodologies ont été mises au point. La technique générique sera la PCR, de laquelle toutes les autres méthodes ont été adaptées. Le rôle de cette étape est de multiplier le nombre de copies de la séquence d'ADN à détecter de manière à augmenter considérablement la sensibilité.

5.3. Méthodes proposées de détection de la mammite

Plusieurs systèmes de détection moléculaires de la mammite ont été mis au point et sont disponibles actuellement. Pour commencer, le PCR quantitatif en temps réel est très populaire pour les applications de diagnostic en tout genre en raison de sa sensibilité élevée et de la possibilité de quantifier le microorganisme détecté à l'aide d'une courbe standard. Le PCR quantitatif consiste en une réaction PCR classique dont il est possible de quantifier le matériel génétique amplifié après chaque cycle d'élongation. Afin de quantifier l'ADN généré après chacun des cycles d'amplification, la stratégie la plus courante est d'utiliser une sonde d'ADN simple brin qui s'hybride spécifiquement sur la portion d'ADN amplifiée. Une extrémité de cette sonde est couplée à un fluorophore reporteur et l'autre à une molécule dite « quencher » qui a pour rôle de masquer la fluorescence du reporteur lorsqu'ils sont situés à proximité l'un de l'autre. Ainsi, cette sonde s'apparie à l'ADN à amplifier de façon séquence-spécifique lors de l'étape d'appariement du PCR. Par la suite, l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase dégrade cette sonde pour polymériser un brin complémentaire. Cette activité libère les nucléotides de la sonde ainsi que le fluorophore reporteur et le « quencher ». Ceux-ci n'étant plus dans une proximité suffisante, le reporteur émet une fluorescence quantifiée par l'appareil qui sera proportionnelle au nombre de réactions PCR simultanées ayant lieu (HOLLAND *et al.*, 1991). Le tableau 2 fait état de plusieurs études qui ont eu recours à cette approche.

Tel que mentionné précédemment, l'avantage principal de toutes les méthodes se basant sur la réaction PCR, est leur sensibilité élevée. Cet avantage peut cependant

devenir problématique dans les cas où l'échantillon analysé est contaminé avec de l'ADN exogène puisque celui-ci peut totalement fausser les résultats, même si celui-ci n'est présent que dans des concentrations infimes. Un contrôle rigoureux de chacune des étapes de préparation de la réaction n'est généralement pas suffisant pour limiter la contamination de type « carry-over ». Ce type de contamination provient de traces d'ADN amplifié au cours de PCR précédentes qui se retrouvent dans une réaction subséquente, une stratégie a donc été mise au point pour l'éliminer. Celle-ci consiste à remplacer une fraction des nucléotides dTTP par des nucléotides dUTP et à utiliser l'enzyme suivante : uracile ADN glycosylase. Le principe de cette méthode repose sur l'incorporation des nucléotides uracile lors de la PCR. Si ces produits d'amplification se retrouvent dans une réaction subséquente, l'enzyme utilisée excisera les bases uraciles du fragment d'ADN laissant des sites abasiques. Ce fragment devient alors impossible à amplifier pour la polymérase, les seuls produits d'amplification obtenus dans la réaction proviendront donc de ceux qui étaient présents dans l'échantillon initial à analyser (Longo et al., 1990).

La compagnie finlandaise Finnzymes Oy a mis sur le marché un test PCR quantitatif en temps réel (PathoProof Mastitis PCR assay) ciblant les espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, les *Staphylococcus* à coagulase négative, *Strep. agalactiae*, *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Peptostreptococcus indolicus*, *Klebsiella* spp. et *Serratia marcescens*. Le gène de résistance aux β -lactamases est également détecté lorsqu'il se retrouve dans le génome de souches de *Staphylococcus*

aureus. La limite de détection de pathogènes dans des échantillons de lait de cette méthode est estimée à 2230 CFU/mL. En raison du nombre de pathogènes à tester et puisque la réaction de PCR en temps réel est limitée dans le nombre de cibles à détecter par le nombre de fluorophores pouvant être utilisés, chaque échantillon est analysé par quatre réactions différentes, testant chacune 4 cibles moléculaires (KOSKINEN *et al.*, 2009; TAPONEN *et al.* 2009).

Un protocole de détection de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus uberis* par PCR quantitatif en temps réel a également été décrit (GILLESPIE et OLIVER 2005). La limite de détection de cet essai se situe entre 100 et 1000 CFU/mL dépendamment de l'espèce à détecter. Cependant, une étape d'enrichissement de l'échantillon de lait permet une capacité de détection limitée à un seul pathogène. Les amorces et les sondes de PCR utilisées ont été décrites ainsi que la méthode d'extraction des bactéries du lait puisque le protocole décrit ne fait pas l'objet d'une application commerciale (GILLESPIE et OLIVER 2005).

L'entreprise canadienne Norgen Biotek commercialise également différents kits de détection à des fins de diagnostic moléculaire. Parmi ceux-ci, certains visent directement les pathogènes causant des infections intramammaires menant à la mammite dont *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus agalactiae*. Ils constituent cependant une solution ayant une capacité de détection à petite échelle puisqu'un seul pathogène est détecté par réaction. Par ailleurs, la détection s'effectue par l'électrophorèse en gel d'agarose bien

qu'un système de détection par la PCR en temps réel puisse être adapté (site Internet de Norgen Biotek, <http://norgenbiotek.com>).

Les micropuces à ADN sont également des outils moléculaires appréciés pour les applications diagnostiques. Elles permettent de tester l'appariement complémentaire d'une séquence spécifique d'ADN dont la séquence est connue à l'ADN contenu dans l'échantillon à identifier sur une lame de verre. Certains systèmes permettent l'analyse de plusieurs échantillons par lame, tel que le propose Agilent (4 ou 8 échantillons). Le nombre d'échantillons analysés par lame demeure toutefois restreint.

La possibilité de discrimination entre plusieurs pathogènes responsables de la mammite par des régions de l'ARN ribosomal 16S ne différant que d'un nucléotide a été exploitée. Pour développer un test de détection de ceux-ci, les auteurs font l'usage de la méthode LDR-UA qui consiste à amplifier l'ADN du gène de l'ARNr 16S d'un échantillon avec des amorces universelles (GERRY *et al.*, 1999). Ensuite, une ligation covalente se produit entre deux amorces complémentaires appariées sur le produit de PCR, elle se produit uniquement si le nucléotide discriminant est apparié. La première amorce, dite discriminante, est marquée d'un fluorophore et contient un nucléotide discriminant à son extrémité 3'. La deuxième amorce, dite commune, se lie en aval de quelques nucléotides de la première amorce. Elle comporte une séquence « zip-code » à son extrémité 3' (Figure 3). Les produits de la réaction de ligation sont hybridés spécifiquement sur une micropuce grâce à la séquence « zip-code » (Figure 4). La

méthode est potentiellement très sensible et possède une capacité élevée de détection allant jusqu'à 100 cibles moléculaires. Son efficacité devra toutefois être éprouvée lorsqu'utilisée avec des échantillons de lait dans un contexte clinique. Dans l'étude décrite, les espèces suivantes ont été ciblées : *Staphylococcus aureus*, CNS, *Strep. agalactiae*, *Strep. bovis*, *Strep. equi*, *Strep. canis*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, *Strep. parauberis*, *Strep. pyogenes*, *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Campylobacter* spp. et *E. coli*. (CREMONESI *et al.*, 2008; CREMONESI *et al.* 2009)

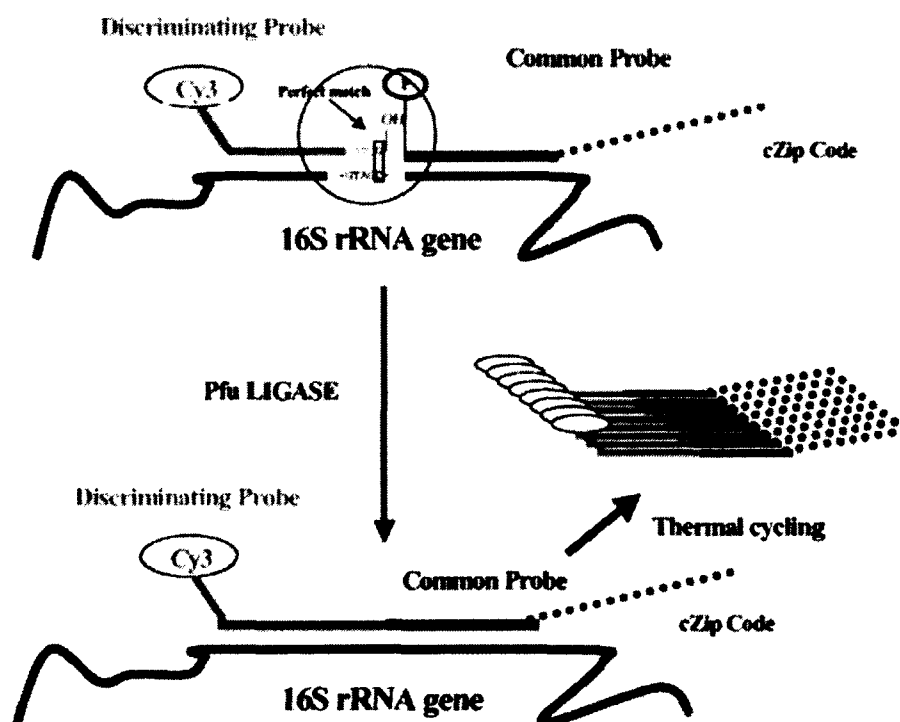


Figure 3. Appariement des amorces et réaction de ligation caractéristique de la méthodologie LDR. Figure tirée de (CASTIGLIONI *et al.*, 2004).

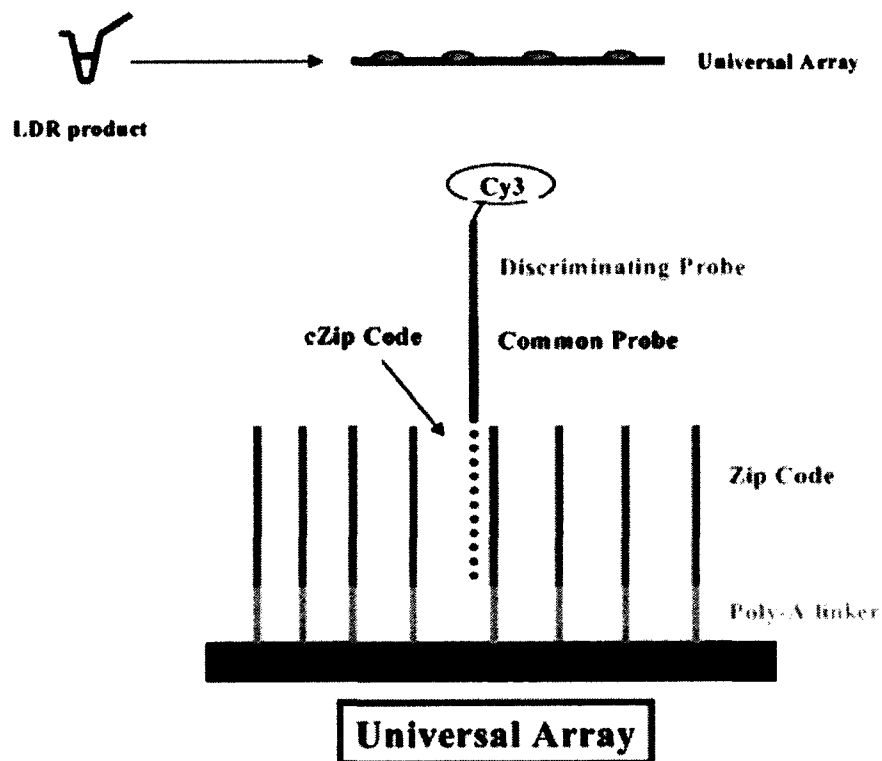


Figure 4. Hybridation du produit de LDR sur la micropuce via la séquence « zip code ». Figure tirée de (CASTIGLIONI *et al.* 2004).

AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

L'article joint à ce mémoire s'intitule « Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk ». Les auteurs de l'article sont Nathalie Bissonnette et Bertrand Cressier. Ci-joint est le formulaire d'autorisation d'intégration d'un article écrit en collaboration à un mémoire dûment signé par les deux coauteurs. L'article a été soumis à la revue *Journal of Dairy Science* le 30 juillet 2010 sous le numéro de soumission suivant : JDS-10-3669.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

La mammite demeure la maladie la plus importante pour l'industrie laitière à travers le monde. Deux éléments importants qui permettraient de mieux contrôler son ampleur sont sans aucun doute la capacité de pouvoir identifier le microorganisme causant l'infection intra-mammaire et la sélection génétique de la résistance à la mammite. Le caractère multifactoriel de cette maladie force l'utilisation d'outils autres que la sélection de caractères phénotypiques qui semblent favorables qui est généralement utilisée pour l'amélioration génétique des bovins laitiers. De manière à mieux recenser les pathogènes retrouvés dans un troupeau et favoriser l'utilisation du traitement vétérinaire le plus adéquat, l'outil le plus approprié serait celui qui permettrait la détection des espèces bactériennes causant les infections. Le but de cette étude est de démontrer la capacité d'une méthode basée sur l'amplification de l'ADN à détecter de façon automatisée les principaux pathogènes majeurs responsables des cas de mammite directement à partir d'échantillons de lait. Les procédures d'extraction et de détection ont été optimisées pour obtenir des résultats à haut débit de façon rapide et peu dispendieuse. Les espèces identifiées par ce test sont : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Strep. uberis*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Klebsiella pneumoniae* et *Mycoplasma bovis*. L'étape de détection comprend l'amplification de régions spécifiques de l'ADN génomique de chacune des espèces par PCR multiplex, la séparation des fragments d'ADN amplifiés par électrophorèse capillaire et leur détection automatisée assistée d'un laser. Diverses

espèces bactériennes appropriées ont été utilisées à titre de contrôles négatifs afin de mettre au point la spécificité des amorces. La procédure d'extraction de l'ADN comprend les étapes suivantes : la centrifugation pour retirer la fraction grasse par décantation, le chauffage de l'échantillon en présence d'ions divalents Chelex-100. En utilisant des échantillons de lait contaminés artificiellement avec les différents microorganismes d'intérêt, la sensibilité analytique est 500 cfu/mL. L'analyse de 172 échantillons de lait contaminés naturellement a permis d'obtenir une sensibilité diagnostique de 95.4% lorsque les résultats sont comparés avec la méthode de référence actuelle, c'est-à-dire la microbiologie classique. La purification des échantillons bruts d'ADN à l'aide d'une méthode à base de billes magnétiques a permis d'améliorer la détection dans certains échantillons parmi les plus altérés physiquement par la présence de caillots et de flocons caractéristiques des cas de mammite. Des résultats faux positifs ont été obtenus suite à l'analyse des échantillons de lait contaminés artificiellement. Parmi ceux-ci, 5 se sont révélés être en fait des vrais positifs suite à une analyse microbiologique subséquente modifiée, ces résultats ont été confirmés par la méthode de séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S. Cet article présente donc l'évaluation qui a été faite d'un système original de détection des pathogènes majeurs causant des infections intramammaires menant à la mammite avec des échantillons de lait contaminés à la fois naturellement et artificiellement. Une telle méthode pourrait être utilisée pour la régie des troupeaux laitiers canadiens et ainsi améliorer nos connaissances sur les pathogènes les plus fréquemment retrouvés et cibler les caractères génétiques désirables pour favoriser la résistance des vaches à la mammite.

Ma contribution à cet article est diverse. J'ai entièrement effectué le développement et l'optimisation de l'étape d'extraction de l'ADN. J'ai optimisé une certaine partie des gènes et des régions génétiques ciblées par les amorces pour chacun des pathogènes. L'optimisation de l'étape de détection, l'évaluation de la spécificité analytique et diagnostique et de la sensibilité diagnostique à partir d'échantillons de lait contaminés naturellement et artificiellement ont été obtenus suite à mes travaux. Le contenu des tableaux et figures de l'article rapportent mes résultats. Pour finir, j'ai rédigé l'ébauche de l'article scientifique et conçu toutes les figures et tableaux de l'article.

ARTICLE SCIENTIFIQUE

Interpretive Summary: Detection of the major mastitis-causing pathogens by a rapid and high-throughput molecular assay. Cressier. Mastitis is the most costly disease for dairy farmers worldwide. The high-throughput recording of mastitis-causing pathogens by the devised assay can now be applied to milk monitoring schemes for eventual integration into a pathogen-detection scheme for commercial dairy cattle. The proposed DNA-based assay is designed to achieve simultaneous detection, at a reasonable cost and in a respectable time frame, for the following species in the same milk sample: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, and *Klebsiella* spp. (including *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*).

Running head: CHELEX-PCR-BASED MASTITIC MILK ANALYSIS

Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk

B. Cressier* and N. Bissonnette*†

*Département de Biochimie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

†Dairy and Swine Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, QC, Canada J1M 1Z3

ABSTRACT

Despite all efforts to control its spread, mastitis remains the most costly disease for dairy farmers worldwide. One key component of better control of this disease is identification of the causative bacterial agent during udder infections in cows. Mastitis is complex, however, given the diversity of pathogens that must be identified. Development of a rapid and efficient bacterial species identification tool is thus necessary. This study was conducted to demonstrate the feasibility of bacterial DNA extraction for the automated molecular detection of major mastitis-causing pathogens directly in milk samples to complement traditional microbiological identification. Extraction and detection procedures were designed and optimized to achieve detection in a respectable time frame, at a reasonable cost, and with a high throughput capacity. The following species were identified: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, and *Klebsiella* spp. (including *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*). The detection procedure includes specific genomic DNA amplification by multiplex PCR for each species, separation by capillary electrophoresis, and laser-assisted automated detection. The specificity of the primers was assessed with a panel of bacteria representing mastitis-negative control species. The extraction protocol comprised multiple steps, starting with centrifugation for fat removal followed by heating in the presence of Chelex-100 to trap divalent ions. The analytical sensitivity was 100 cfu/mL for milk samples spiked with *Staph. aureus*, *Strep. dysgalactiae*, and *E. coli*, with a tendency for *K. pneumoniae*. The detection limit was 500 cfu/mL for *Strep. uberis* and *Strep. agalactiae*. The overall diagnostic sensitivity (95.4%) and specificity (97.3%) were

determined in a double-blind randomized assay by processing 172 clinical milk samples with microbiological characterization as the gold standard. When the physical nature of the milk samples was too altered, DNA purification with a magnetic bead-based system was used. Of the apparent false-positive samples, 5 were identified by specific microbiological analysis as true-positive *Staph. aureus* co-infections, with further confirmation by ribosomal 16S sequencing. The proposed methodology could therefore become an interesting tool for automated PCR detection of major mastitis pathogens in dairy cattle.

Key words: bovine intramammary infection, mastitic molecular analysis, multiplex polymerase chain reaction (PCR), sensitivity, specificity

INTRODUCTION

In recent years, dairy farm management and hygiene improvement programs have been established in many countries, reducing the number of reported cases of mastitis. However, mastitis remains the most important disease for the dairy industry: in the United States, the mean estimated cost per clinical case, taking into account reduced milk yield, premature culling, and veterinary treatments, is US\$179 (Bar et al., 2008). Therefore, there are still more measures to be taken to lower the impact of this disease on the income of dairy farmers. One such measure is identification of the causative agent. Once the agent is identified, appropriate measures, whether antibiotics, isolation of the

affected cattle to prevent the spread of contagious mastitis, or even culling, can be implemented.

Mastitis-causing pathogens have traditionally been detected and identified with microbiological cultures and biochemical tests. This process is time-consuming and does not allow the analysis of bronopol-preserved composite milk samples, because the identification of non-viable bacteria is impaired. Moreover, an important fraction (20 to 30%) of the milk samples taken from udders with clinical mastitis test negative (Taponen et al., 2009, and references within). A large proportion of these no-bacterial-growth results are recognized as false negatives, because the conventional microbiological methods failed to detect most of the bacterial species found in the milk samples, whereas molecular detection confirmed the presence of bacterial genomic DNA. These microbiologically negative samples often contain several common mastitis pathogens, some of them even displaying high bacteria counts, as shown by a quantitative PCR detection assay (Taponen et al., 2009).

Molecular detection assays are a promising avenue to resolve those false negative issues, and many assays have already been developed (Santos et al., 2008; Koskinen et al., 2009; Kuang, 2009; Supre et al., 2009; Taponen et al., 2009). For several reasons, a multiplex PCR-based assay could be best suited for identifying mastitis-causing pathogens (Gillespie and Oliver, 2005). The main benefit of multiplex PCR over other molecular methods is its cost: it is cheaper because all species can be amplified in a single reaction. With real-time PCR methods, the number of different targets that can be amplified is limited to 4 per reaction because each target carries a different dye whose individual emission spectrum must not overlap the others for specific detection. With

capillary electrophoresis systems, multiplex PCR reactions yield fragments that can be identified both by their specific fragment length and by their respective fluorescent emission. Whereas real-time PCR is based on specific fluorescent emission, fragment length analysis by capillary electrophoresis accounts for both.

The main goal of this study was to devise a mastitis pathogen extraction and detection procedure for use on raw milk samples without further enrichment, despite the altered physical complexity of clinical milk. The work was focused on achieving a low cost, high throughput capacity, and fast turnaround time. The bacterial species targeted for identification in milk were *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, and *Klebsiella* spp. (including *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*). The molecular assay included a positive detection control that was added at the extraction step, namely *Lactobacillus rhamnosus*, a species that is not found in the lactating mammary gland with or without the occurrence of mastitis. The proposed method includes an extraction procedure suitable for all the species to be detected. As a result of the use of 5'-marker dyes associated with each forward primer set in the multiplex PCR reaction, discrimination among target species is based on dye signals as well as the capacity of capillary electrophoresis to separate PCR products based on fragment length, as a result of the multiplexed design. Resolution and sensitivity are increased in comparison with agarose gel electrophoresis. Because the capillary electrophoresis apparatus contains genetic analysis software, identification of PCR products is automated. This methodology is a good way to increase high-throughput analysis by keeping costs low in the development of a new alternative PCR-based assay.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Milk Samples and Conventional Microbiological Analysis

Mastitic milk samples were taken from cows showing signs of clinical mastitis in commercial dairy herds. All the mastitic samples were collected by veterinarians during the daily practice of the ambulatory clinic and sent to the clinical bacteriology laboratory at the Faculté de Médecine Vétérinaire of the Université de Montréal, Montreal, QC. Mastitis milk samples were defined criteria according to the International Dairy Federation (IDF, 1999). The milk samples were kept on ice during transport and inoculated on reception onto a tryptic soy agar (TSA) plate enriched with 5% sheep blood (BBL; Becton Dickinson and Co., Cockeysville, MD). The analyses were performed according to National Mastitis Council (NMC) guidelines (NMC, 2004). Following this first analysis, these mastitic samples were sent to the authors' laboratory, where a second and independent microbiological analysis was carried out. An aliquot of the stock (0.1 mL) was plated on TSA esculin blood agar plates (5% defibrinated sheep blood), and the remainder of the sample was aliquoted and kept frozen until molecular analysis. Bacterial growth, colony morphology, and hemolysis patterns were observed after incubation at 37°C for 24 h, and a second reading was taken at 48 h. The morphological characteristics (e.g. color, form) following Gram staining were registered. The samples showing a positive reaction to Gram staining were further characterized by catalase and tube coagulase tests (BBL). Catalase- and coagulase-positive isolates were classified as *Staph. aureus*. Catalase-negative Gram-positive cocci were classified as *Strep.*

agalactiae, *Strep. dysgalactiae*, and *Strep. uberis* based on their capacity to hydrolyze hippurate, to perform fermentation of trehalose, mannitol, and sorbitol, to grow on 5 M NaCl, and to express the CAMP factor. Esculin hydrolysis, although found variable for *Strep.* species, was also performed. Gram-negative colonies were streaked on MacConkey agar plates and in Simmons citrate agar tubes. Isolates showing negative reactions were identified as *E. coli*, and colonies showing positive reactions were further tested with motility indone ornithine (MIO) medium for identification of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*. All media and biochemical test reagents were from Quelab Laboratories Inc. (Montreal, QC) unless otherwise indicated.

The mastitic samples were classified as single-infected when only 1 species was detected by the microbiological analysis and dual-infected when 2 species were detected. Contaminated samples, defined as showing growth of 3 or more pathogens from the same sample, were excluded, as described elsewhere (Dingwell et al., 2003). All samples were processed according to the Chelex DNA extraction and multiplex PCR detection protocol.

Chelex DNA Extraction

The DNA extraction protocol is intended to directly process 1 mL samples of crude milk using a 96-well plate-compatible liquid workstation. The milk was first clarified by adding 0.5 mL 0.5 M EDTA (MJS BioLynx Inc., Brockville, ON) (Grattepanche et al., 2005) and 0.1% Tergitol 05-07-5 (The Dow Chemical Company, Varennes, QC). Following incubation for 10 min at room temperature, the clarified milk

samples were centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min. The supernatant, including the fat fraction, was discarded. The pellet was washed twice with 1 mL molecular-grade water, resuspended in 20 μL , and incubated at 37°C for 30 min with 0.4 μg lysostaphin (Sigma-Aldrich Co., Oakville, ON), unless stated otherwise. The DNA extraction included Chelex (iminodiacetic acid) ionic resin and rapid boil treatments as described elsewhere (Weisburg et al., 1991; Giraffa et al., 2000; Kim et al., 2001) but with minor modifications. In that process, 180 μL of a 10% Chelex-100 slurry (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON) was added. The pellet was boiled at 100°C for 10 min and chilled on ice for 10 min. After centrifugation at $13,000 \times g$ for 5 min, the supernatant was transferred to a clean tube. The aliquots were kept at -80°C until they were used as templates for PCR. An additional purification step was included in the protocol for samples with heavy physical alterations like clots and flakes; that step involved magnetic beads for DNA purification, as described elsewhere (Day et al., 2009). The GenFind V2 DNA purification protocol (Agencourt Bioscience Corp., Beverly, MA), designed for blood or tissue samples, was adapted for milk samples. The supernatants obtained from the Chelex slurry boiling step (200 μL) were mixed with 400 μL lysis buffer and 9 μL proteinase K and incubated at 37°C for 10 min. The binding buffer (300 μL) containing magnetic beads was added and mixed by pipetting. After 5 min at room temperature, DNA was captured by the magnetic beads, and the plate was transferred onto the magnetic plate for 15 min. The supernatant was discarded. The plate was taken off the magnet, and the DNA beads were washed twice with 800 μL and 500 μL wash buffer 1 and wash buffer 2, respectively. The plate was then put back on the magnet to discard the

supernatant. The captured DNA was eluted with 40 μ L elution buffer. All the chemicals used for this step were supplied with the GenFind V2 kit.

Analytical Specificity

The primers listed in Supplementary Table 1 are specific to a genomic region or gene for each species, as reported elsewhere (footnote, Supplementary Table 1). The primers were synthesized by Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the GenBank nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used for in silico validation of perfect similarity with the respective specific regions. Standard PCR-based reactions were used to confirm the unique gene target and species specificity. Polymerase chain reactions were carried out in 25 μ L volumes containing 2.5 μ L 10X buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 200 mM KCl, Tween 20, and enzyme stabilizers), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.2 μ M of each primer, 1 U Taq polymerase (BioShop Canada Inc., Burlington, ON), 10 ng purified template DNA, and 18 μ L HyClone molecular biology-grade water (Thermo Scientific Inc., Logan, UT). To test the analytical sensitivity of the PCR design, a total of 295 strains isolated from mastitic milk samples and analyzed by conventional microbiological analysis were used: 60 *Staph. aureus*, 56 *Strep. uberis*, 46 *Strep. dysgalactiae*, 40 *Strep. agalactiae*, 61 *E. coli*, 27 *K. pneumoniae*, and 4 *K. oxytoca* strains. The cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)/NaCl DNA extraction method (Wilson, 2001) was used to purify genomic DNA from bacterial culture. A selection of the most pertinent negative control species was also extracted

(Supplementary Table 2). These control species were included on the basis of 2 main criteria: closely related phylogenetic analysis, and the probability of finding them in bovine milk samples. The bacterial genomic DNA was quantified using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE). To validate the specificity of the primers, the PCR products were separated by electrophoresis through a 1.5% (wt/vol) agarose gel in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.4) and stained with 0.5- μ g/mL ethidium bromide (Sigma-Aldrich Co.), and the results were recorded using the FluorChem SP imaging system (Cell Biosciences Inc., Santa Clara, CA).

Analytical Sensitivity

To determine the analytical sensitivity of the molecular detection, milk samples were artificially contaminated with a bacterial load of known cfu, as described elsewhere (Quaglia et al., 2005). For the bacterial spiking assays, milk samples were aseptically collected as described elsewhere (Roy et al., 2007) from healthy dairy cows, defined based on several observations (e.g. normal appetite, locomotion, and behavior) including normal milk appearance (e.g. no bacterial growth) for several consecutive samplings over a 3-weeks period. The absence of pathogens was confirmed by plating several aliquots of 100 μ L aliquots of milk on TSA plates.

The cfu aliquots used in the spiked-milk assays were prepared from a log culture. An overnight culture was used as a starter to prepare the fresh bacterial culture, which was then grown for 3 to 5 h. Gram-negative bacteria were washed with PBS, whereas

0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.) was added to the wash buffer for Gram-positive bacteria. The log culture was serially diluted, and aliquots were stored at -80°C in 20% glycerol. The bacterial dispersion was confirmed by visual examination under microscope. Several aliquots of each dilution stock were serially diluted, when required, and plated on tryptic soy broth (TSB) plates to evaluate the concentration (cfu/mL) of the working stock. The concentration of frozen stock was periodically evaluated to confirm bacterial viability. To determine the analytical sensitivity of the extraction procedure, 50 μL of the appropriately diluted stock culture was spiked in 950 μL pathogen-free milk. All samples were processed according to the Chelex DNA extraction and multiplex PCR detection protocol.

Multiplex PCR and Fragment Length Analysis

Multiplex PCR was performed using the panel of primers (at the concentrations indicated in Supplementary Table 1) and Multiplex PCR Master Mix (Qiagen Inc., Mississauga, ON) according to the manufacturer's instructions with slight modifications. The primer mix included each target set comprising the forward and reverse primers. Reactions were carried out in 25 μL volumes, which included 2 \times Master PCR Mix volumes (including MgCl_2 , dNTP, and hot-start DNA polymerase in an optimized buffer), 5 μL primer mix, 0.4 mM deoxyuridine triphosphate (dUTP) (Fermentas Canada Inc., Burlington, ON), 0.15 U uracil-DNA-glycosylase (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON), 2 μL template DNA, and sterile HyClone water (Thermo Scientific) to bring the total volume to 25 μL . In the presence of dUTP and uracil-N-glycosylase

(UNG) (Invitrogen), a pre-PCR incubation step at 37°C for 10 min was performed in a Biometra TGradient thermocycler (Montreal Biotech Inc., Montreal, QC). The PCR conditions consisted of an initial activation (hot-start) step at 95°C for 15 min, followed by 35 cycles of amplification (95°C for 30 s, 59°C for 90 s, and 72°C for 30 s) and a final extension step at 72°C for 10 min. For fragment length analysis by capillary electrophoresis, 1 µL of a 1-in-10 dilution of each PCR product was analyzed with a 96-well plate containing 8.8 µL deionized formamide and 0.2 µL LIZ-500 size standard (Applied Biosystems). The samples were incubated at 95°C for 3 min and chilled on ice for 10 min. Capillary electrophoresis was performed with Performance Optimized Polymer-4 (POP-4) (Applied Biosystems) on an ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The samples were injected at 1 kV for 20 s and electrophoresed at a constant voltage of 15 kV for 25 min at 60°C. Raw data were treated by GeneMapper software (Applied Biosystems) with the allele recognition feature. This simultaneous detection involved a fragment length analysis further discriminated by the nature of the dye used for the PCR (Supplementary Table 1). Each electropherogram was visualized to confirm the concurrence of the data regarding the shape of the peaks.

Carry-Over Contamination Control

The use of UNG into the PCR reactions prevents contamination by previously amplified DNA (carry-over) when deoxythymidine triphosphate (dTTP) is substituted for dUTP (Longo et al., 1990), an approach that was introduced for molecular diagnosis by real-time PCR (Pruvost et al., 2005). The dUTP residues were included in the Multiplex

PCR Master Mix, which already contains all 4 dNTP. To evaluate the adequate incorporation of uracil residues, both dUTP incorporation and the UNG treatment were optimized. A first multiplex PCR reaction was performed using 10 ng purified genomic DNA with increasing amounts of dUTP (0 to 1,000 μ M). These first PCR products mimicked contaminations that were serially diluted and used as templates in a second multiplex PCR reaction. Prior to that second reaction, the different amplified PCR products (0 to 1,000 μ M) were treated with UNG. The UNG-treated PCR products were analyzed by fluorescent fragment analysis. This method made it possible to evaluate the minimum concentration of dUTP required to eliminate the simulated carry-over contamination without affecting PCR amplification. The efficient degradation of uracil-containing template was confirmed by the absence of a PCR product in the second reaction, as detected by capillary electrophoresis.

Sequencing

Sequencing reactions were processed in two instances during this study. First, to confirm the specificity of primers, the PCR products amplified by each primer pair listed in Supplementary Table 1 were sequenced. Second, when a false-positive PCR product arose from milk sample analysis, further identification was performed by sequencing the 16S rRNA gene. To recover *Staph. aureus* or *E. coli* (including *Klebsiella* spp.) from the false-positive samples, milk was plated on selective media, namely mannitol salt agar for *Staph. aureus* and MacConkey agar for *E. coli*. Strains were selected, and standard PCR was performed on bacterial genomic DNA using the universal forward primer 27F

(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) (Weisburg et al., 1991) and reverse primer 788R (GGACTACCAGGGTATCTAA) (Therese et al., 1998) with the following conditions: initial denaturation step of 94°C for 3 min, 35 cycles of amplification (94°C for 30 s, 47°C for 90 s, and 72°C for 60 s), and final amplification at 72°C for 10 min. The PCR products were purified on NucleoSpin Extract II purification columns (MJS BioLynx), and DNA was quantified using an ND-1000 spectrophotometer. Sequencing reactions were carried out using BigDye chemistry (Applied Biosystems) as described by the manufacturer. The sequences obtained were compared with the GenBank database (Benson et al., 2010) using the BLAST tool (Altschul et al., 1990). Identified genera of putative isolates grown from false-positive samples were analyzed using the Sequence Match tool from the Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009).

Diagnostic Sensitivity and Specificity

For the molecular investigation, all the mastitic milk samples were assigned a random number and used in a double-blind randomized assay. Analysis was carried out on 172 mastitic milk samples. Molecular diagnostic results for the milk samples were compared with microbiological identification, the gold standard. The diagnostic sensitivity is the ability to detect by molecular assay the pathogen found by conventional microbiological culture. The diagnostic sensitivity was determined as follows: $(\text{number of true positives})/(\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}) \times 100$. The diagnostic specificity is the ability to obtain a negative signal for the pathogen when not detected by culture and was determined as follows: $(\text{number of true negatives among the})$

153 milk samples)/(number of true negatives + number of false positives) × 100 (Martin, 1984). In each dual-infected milk sample, both species had to be identified to mark the sample as a true positive. A threshold of 300 relative fluorescence units (RFU) on the electropherogram was set for identifying a result as positive for a given targeted species in processed milk samples from clinical mastitis cases.

Statistical Analysis

Basic statistical analyses were performed using Excel, and an ANOVA (assuming unequal variances) was performed using SAS (Statistical Analysis System, Release 9.1, 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC) with a Tukey correction for multiple comparisons among concentration levels. A nonparametric analysis (Kruskal–Wallis test; not shown) was used for further confirmation of statistical significance.

RESULTS

Rapid Boiling and Chelex-100 Treatment

The protocol is rapid and technically easy, not requiring the use of lysis detergent, corrosive and toxic organic solvents, high-salt precipitation, and column-based purification system. The method includes a first centrifugation step. The presence of EDTA to clarify milk by disrupting the micelles substantially reduced micelle precipitation and therefore the volume of the pellet, leaving a small white trace in most

milk samples. In the absence of the detergent, centrifugation of the raw milk produced an upper fat layer that was difficult to discard and left substantial lipid residuals that hindered subsequent PCR assays. The addition of Tergitol partially homogenized the raw milk, leaving a thin and very fluid fat layer that was easily discarded by decantation. Concentrations of Tergitol detergent ranging from 0.01 to 1% were tested. There was no significant improvement in the physical appearance of the milk centrifuged in the presence of 0.01% Tergitol. Both 0.1 and 1% Tergitol improved the fluidity of the fat layer. The use of 1% detergent significantly decreased the recovery and viability of *L. rhamnosus* (in both the pellet and the fat layer) but did not affect the recovery of *Staph. aureus* in the pellet. The effect of Tergitol on the viability of *L. rhamnosus* was much milder at 0.1% than at 1%. As a result, the following experiments were performed with 0.1% Tergitol. The molecular detection was tested using raw milk artificially contaminated with known amounts of cfu prepared from bacterial culture. The analytical sensitivity of the method was determined using bacterial genomic DNA extracted using the rapid boiling method either alone or with Chelex-100. The rapid boiling treatment allowed the PCR-based detection of all the pathogens tested, including *L. rhamnosus* used as an external spiking control for the extraction method. The addition of Chelex-100 improved pathogen detection over a broad range of cfu concentrations. The resin is known to be a strong chelator of divalent ions and could also protect genomic DNA from damage by these ions at high temperatures. The resin might trap calcium ions from milk or other PCR inhibitors, because an increased amount of resin improved detection. The presence of inhibitors was confirmed when it was observed that boiling the sample in larger volumes resulted in better detection for mastitic milk samples. The detection limits

of the Chelex-based milk-derived DNA purification protocol observed by agarose gel electrophoresis analysis were generally established at 10^3 bacteria/mL milk (data not shown).

The addition of lysostaphin at the cell-wall lysis step improved the detection of *Staph. aureus*. Whereas 40 μ g lysostaphin in a 20 μ L volume inhibited the downstream PCR amplification (Figure 5, lanes 1 to 2), 0.4 μ g was sufficient to recover DNA from milk samples contaminated with 10^3 or 10^4 cfu (Figure 5, lanes 5 and 6, respectively).

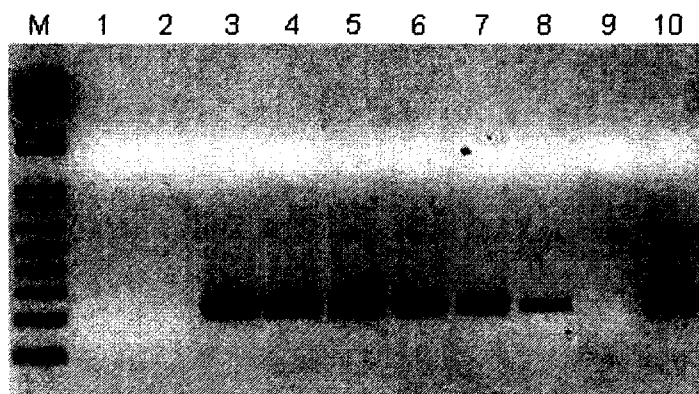


Figure 5. Effect of lysostaphin treatment on detection of *Staphylococcus aureus*. Milk samples were treated with 40 μ g (lanes 1 and 2), 4 μ g (lanes 3 and 4), or 0.4 μ g (lanes 5 and 6) lysostaphin, or without lysostaphin (lanes 7 and 8). Milk samples were spiked with 10^4 (lanes 1, 3, 5, and 7) or 10^3 (lanes 2, 4, 6, and 8) cfu *Staph. aureus*/mL. Lane 9, no-template control; lane 10, PCR control (10 ng genomic DNA); lane M, 100-bp DNA ladder.

Optimization of UNG-dUTP

Carry-over contamination is an important topic for diagnostic laboratory applications. To avoid the carry-over PCR amplification of former amplicons in a subsequent reaction, dUTP residues were added to the Multiplex PCR Master Mix. The incorporation of dUTP was optimized because this ready-mix PCR buffer already contains dNTP, which includes dTTP, the dUTP nucleotide competitor. For all the tested gene targets, a concentration above 600 to 800 μM dUTP inhibited the PCR reaction. With an artificial carry-over contamination approach, the appropriate concentration of dUTP and UNG to inhibit subsequent amplification was evaluated using fluorescent fragment analysis by capillary electrophoresis as described in the Materials and Methods section. The conditions that prevented PCR inhibition and enabled the complete degradation of the PCR contamination were found to be 400 μM dUTP and 0.15 U UNG (data not shown).

Standard and Multiplex PCR

The analytical specificity of the primer pairs designed to target genes specific to each pathogen was tested by standard PCR and analyzed by agarose gel electrophoresis. The analytical specificity of the PCR assay was confirmed using bacterial DNA isolated from a culture prepared with a strain isolated from the mastitic milk samples. The specificity of the primer design was confirmed on the following strains: 60 *Staph. aureus*, 56 *Strep. uberis*, 46 *Strep. dysgalactiae*, 40 *Strep. agalactiae*, 61 *E. coli*,

27 *K. pneumoniae*, and 4 *K. oxytoca* strains. A representative result for the analysis of *E. coli* and *K. pneumoniae* is shown in Figure 6.

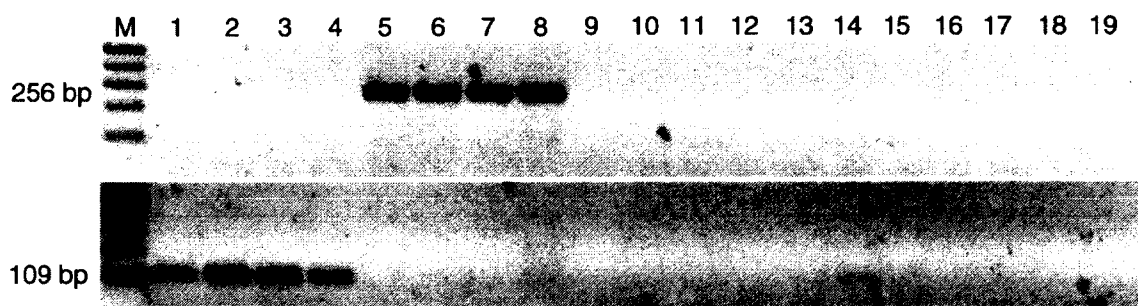


Figure 6. Primer specificity assessment with positive and negative control species. The PCR reactions were performed with *Escherichia coli* primers (upper panel) and *Klebsiella* spp. (lower panel) using 10 ng bacterial genomic DNA purified from the following: lanes 1 and 2, *K. pneumoniae*; lanes 3 and 4, *K. oxytoca*; lanes 5, 6, 7 and 8, *E. coli*; lane 9, *Pasteurella multocida*; lane 10, *Proteus mirabilis*; lane 11, *Prot. vulgaris*; lane 12, *Pseudomonas aeruginosa*; lane 13, *Pseud. putida*; lane 14, *Raoultella planticola*; lane 8, no-template control; lane M, 100-bp DNA ladder.

The molecular analytical specificity of the PCR was 100% for all targets tested both in standard and multiplex PCR using purified bacterial genomic DNA (data not shown), with the exception of one case. Whereas this clinical case was qualified as *E. coli* by both laboratories, it was molecularly positive for both *wecA* and *khe*. Further analysis revealed an additional Gram-negative strain present in the milk sample that was confirmed to be *Raoultella planticola* by *rpoB* sequencing in 2006 and further confirmed by multilocus sequence typing (MLST) by Dr. Ruth Zadoks, Cornell University (data not shown). The

molecular test cannot distinguish *Klebsiella* spp. from *R. planticola*, whereas the microbiological assay cannot distinguish *E. coli* from *R. planticola*. This Gram-negative mastitis case was analyzed as false positive for *Klebsiella* spp. Supplementary Table 2 summarizes the species used as negative controls. The PCR-based design generated amplicons ranging from 109 to 281 bp (Supplementary Table 1) that produced the same fragment length profiles, as detected by both agarose gel (Figure 7a) and capillary (Figure 7b) electrophoresis.

Figure 7a

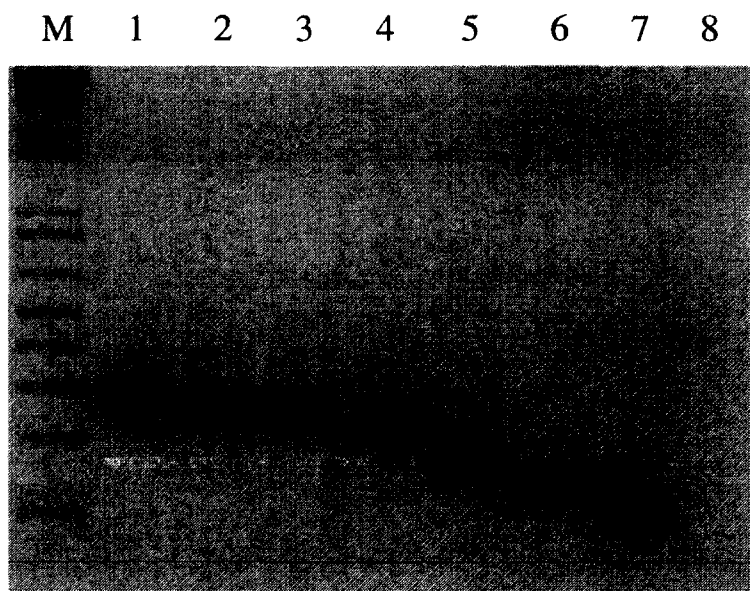


Figure 7b

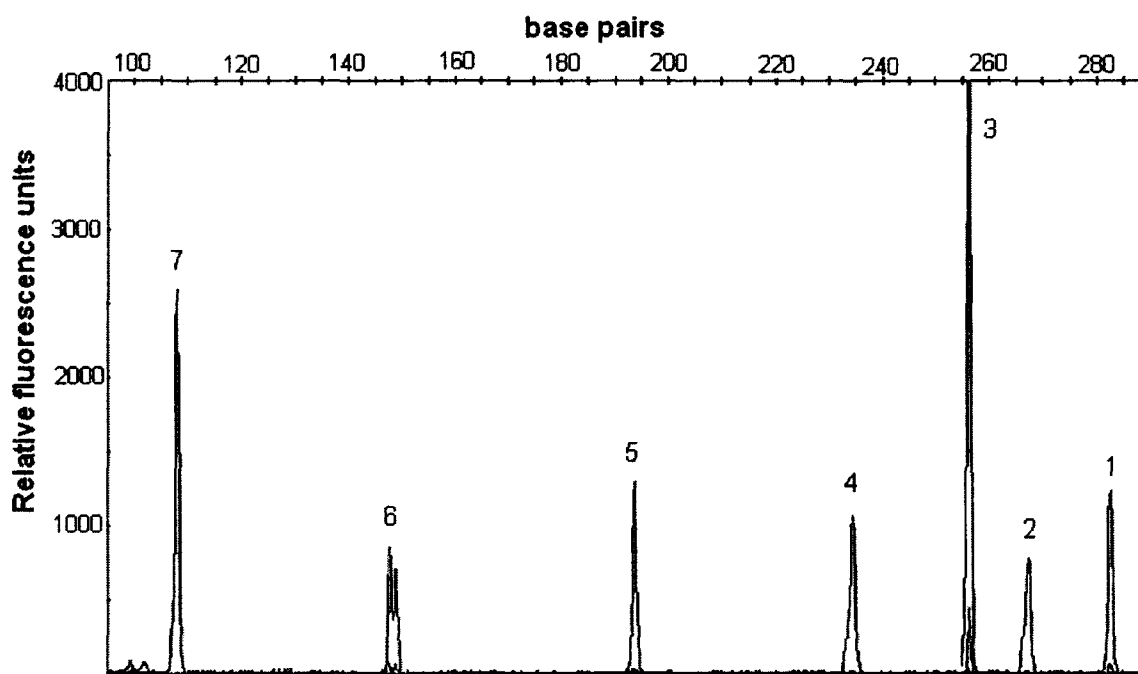


Figure 7. Electrophoresis of multiplex PCR. The PCR reactions were performed on individual species (a) and with a pool of purified genomic DNA (b). The equivalent of 10 and 0.1 μ L of the PCR reactions were analyzed by agarose gel electrophoresis (a) and capillary electrophoresis (b), respectively. Lane/peak 1, *Lactobacillus rhamnosus*; lane/peak 2, *Escherichia coli*; lane/peak 3, *Streptococcus dysgalactiae*; lane/peak 4, *Staphylococcus aureus*; lane/peak 5, *Strep. agalactiae*; lane/peak 6, *Strep. uberis*; lane/peak 7, *Klebsiella pneumoniae*; lane 8, no-template control; lane M, 100-bp DNA ladder.

Recovery and Analytical Sensitivity from Milk Samples

To assess the analytical sensitivity of the PCR-based system, the Chelex-100 boiling extraction procedure was tested with the 6 most prevalent mastitis pathogens at concentrations of 100, 500, 1,000, and 5,000 cfu/mL raw milk. The mean RFU values measured in 3 independent experiments using fragment length analysis by capillary electrophoresis are shown in Figure 8.

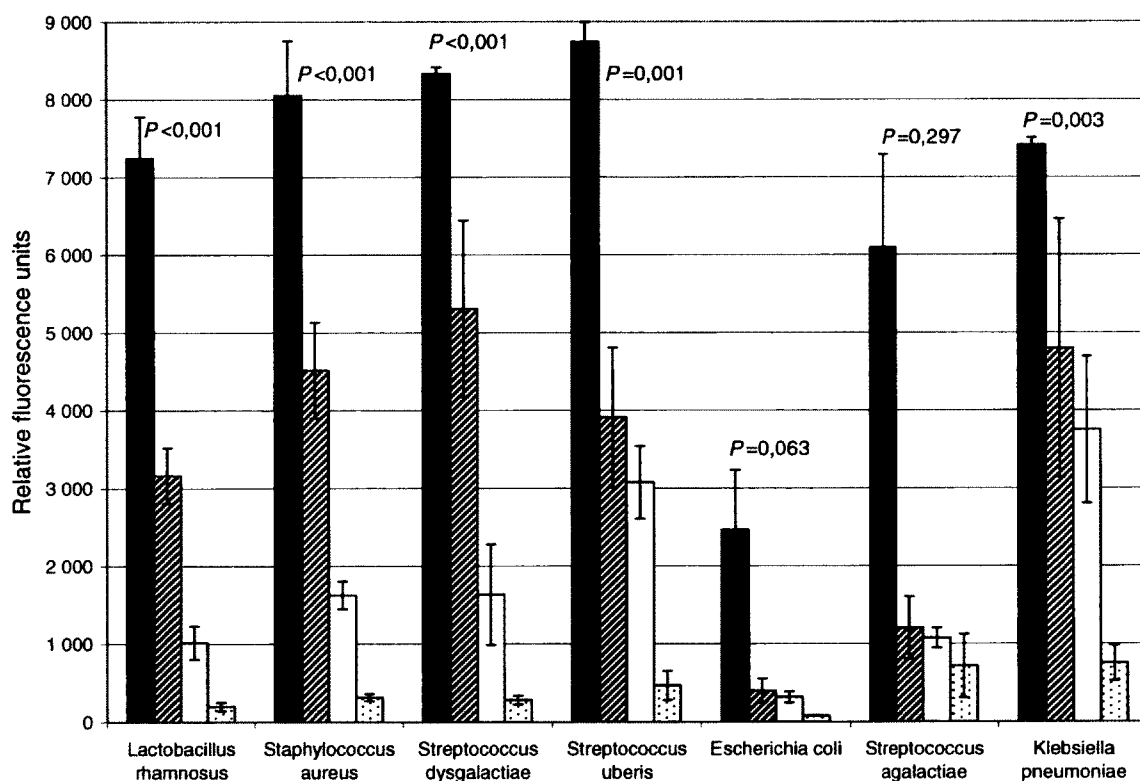


Figure 8. Analytical sensitivity assessment of milk samples artificially contaminated with the major mastitis-causing pathogens. The relative fluorescence units obtained following capillary electrophoresis are the results of 3 independent experiments, reported as means

and s.e.m., for each pathogen spiked at the following concentrations: 5,000 (solid bar), 1,000 (dashed bar), 500 (open bar), and 100 (spotted bar) cfu/mL.

The fluorescent PCR-based system increased the sensitivity compared to the agarose gel electrophoresis analysis, with a detection limit of 100 cfu/mL for *Staph. aureus* ($P = 0.001$), *Strep. dysgalactiae* ($P = 0.037$), *L. rhamnosus* ($P = 0.007$), and *E. coli* ($P = 0.005$), and a tendency for *K. pneumoniae* ($P = 0.079$). The detection limit was 500 cfu/mL for *Strep. uberis* ($P = 0.022$) and *Strep. agalactiae* ($P = 0.014$). Detection was quantitative for spiked milk at concentrations ranging from 100 to 5,000 cfu/mL for most pathogens, including *E. coli* (tendency; $P = 0.063$), which was found to be significant using nonparametric Kruskal–Wallis analysis ($P = 0.023$). The exception was *Strep. agalactiae* ($P = 0.086$), which presented important detection variability among replicates. For the milk samples spiked with more than 5,000 cfu/mL, saturation of the signal from the Genetic Analyzer detector was reached (~8,000 RFU), and detection was no longer quantitative but did remain qualitative. For the clinical milk sample analysis, setting the detection threshold at 300 RFU resulted in the limit of the fluorescent capillary electrophoresis system using the Chelex–PCR-based DNA extraction procedure being defined as quantitative within the 1-log₁₀ range of 500 to 5,000 cfu/mL milk and as qualitative for a broad range above the pathogens' respective detection limits (100–500 cfu/mL). The method allows detection of subclinical forms of intramammary infections which were selected based on elevated SCC (>250,000 cells/mL) but not detected by the herdsman because of the absence of apparent clinical signs (local herd, data not shown).

Clinical Milk Sample Analysis

A total of 172 milk samples from cows with clinical mastitis were characterized by 2 independent laboratories using standard microbiological methods. Of these samples, 153 contained 1 of the bacterial species targeted in this study, and 19 contained 2 species (Tables 3 and 4, respectively). The results are classified according to this microbiological identification, on which both laboratories agreed. To challenge the extraction protocol and the PCR-based detection assay, these samples were processed accordingly (Chelex DNA Extraction section, Materials and Methods), and the results are summarized in Tables 3 and 4. Of the 153 samples infected by a single pathogenic species, 7 were not detected by the molecular analysis (false negatives), and 24 false-positive targets were identified (Table 3). The most frequently encountered false-positive result was for *E. coli* (7 cases) followed by *Staph. aureus* (6 cases, not 10). Of the 19 samples from which 2 bacterial species were identified (dual infection), the combination of *Staph. aureus* and *Strep. dysgalactiae* was the most frequent, being found 13 times. The clinical milk samples identified as containing 2 species displayed a higher rate of false results, with 4 false-positive and 5 false-negative results obtained among 19 samples (Table 4).

Table 3. Cross-classification of the Chelex–PCR-based results obtained from the analysis of 153 single-infected milk samples

Microbiological identification ¹		Molecular identification						
Species ²	n	<i>Staph. aureus</i>	<i>Strep. uberis</i>	<i>Strep. dysgalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebs. spp.</i>	False negative
<i>Staph. aureus</i>	52	50	2			3		2
<i>Strep. uberis</i>	27	2 ³	25	2		2		2
<i>Strep. dysgalactiae</i>	29	7 ³		28		2	1	1
<i>Strep. agalactiae</i>	9				9			0
<i>E. coli</i>	25	1		1	1	25	1 ⁴	0
<i>Klebsiella spp.</i>	11						9	2
Total	153	60	27	31	10	32	10	
False positive		4	2	3	1	7	2	

¹Samples were processed according to National Mastitis Council standards by

2 independent laboratories.

²*Staph.*: *Staphylococcus*; *Strep.*: *Streptococcus*; *E.*: *Escherichia*; *Klebsiella*/*Klebs. spp.*:

K. pneumoniae and *K. oxytoca*.

³Further microbiological analysis on selective media confirmed the presence of the pathogens in some of these samples despite the absence of detection during the initial microbiological identification.

⁴Further molecular analysis confirmed the identity of *Raoultella planticola* by *rpoB* sequencing and further multilocus sequence typing (MLST) analysis (laboratory of Dr. R. Zadoks, Cornell University).

Table 4. Cross-classification of the Chelex-PCR-based results for 19 dual-infected milk samples

Microbiological identification		Molecular identification						False negative
Species ¹	n	<i>Staph. aureus</i>	<i>Strep. uberis</i>	<i>Strep. dysgalactiae</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebs. spp.</i>	
<i>Staph. aureus</i> and <i>Strep. dysgalactiae</i>	13	9	1	13		2 ²		4
<i>Staph. aureus</i> and <i>Strep. uberis</i>	2	2	2	1				0
<i>Klebs. spp.</i> and <i>Strep. uberis</i>	1						1	1
<i>E. coli</i> and <i>Strep. uberis</i>	1		1			1		0
<i>Staph. aureus</i> and <i>Strep. agalactiae</i>	1	1		1	1			0
<i>E. coli</i> and <i>Strep. dysgalactiae</i>	1			1		1		0
Total	19	12	4	16	1	4	1	5
False positive		0	1	2	0	1	0	4

¹*Staph.*: *Staphylococcus*; *Strep.*: *Streptococcus*; *E.*: *Escherichia*; *Klebsiella/Klebs. spp.*:
K. pneumoniae and *K. oxytoca*.

²Further microbiological analyses revealed the presence of *E. coli* in one of these samples.

Adaptation of the GenFind V2 DNA Purification Protocol

For some of the mastitic samples, the physical appearance of the milk was altered by the presence of clots and flakes. These alterations hindered the extraction procedure and impaired the PCR-based molecular detection. The GenFind V2 magnetic-bead system was introduced to further purify DNA from these Chelex-treated DNA samples. That system allowed the specific identification of 17 pathogens in milk samples that were considered to be false negatives among the 172 clinical milk samples analyzed with the Chelex-based DNA protocol. These 17 results were obtained mainly from mastitic milk samples containing clots and flakes. The GenFind V2 magnetic-bead system increased the diagnostic sensitivity by nearly 10%.

Diagnostic Sensitivity and Specificity

The overall diagnostic sensitivity of the assay was 95.4%, and the overall diagnostic specificity was 96.9%. One clinical sample that was initially identified as a single infection of *E. coli* was found to be positive for both *wecA* (*E. coli*) and *khe* (*Klebsiella* spp.). However, further characterization revealed the presence of *E. coli* (*wecA*) and *R. planticola* (*khe*), both Gram-negative species (data not shown). Table 5 summarizes the PCR-based diagnostic sensitivity and specificity values for the clinical samples identified as containing only 1 bacterial species by means of the gold standard detection method (microbiological analysis).

Table 5. Diagnostic sensitivity and specificity of the PCR-based analysis of clinical mastitis samples

Targeted species (gene)	True positive	False negative	Diagnostic sensitivity (%)	True negative ¹	False positive	Diagnostic specificity (%)
<i>Staphylococcus aureus</i> (nuc)	50	2	96.2	95	6	94.1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (16S–23S intergenic region)	28	1	96.6	121	3	97.6
<i>Streptococcus uberis</i> (pauA)	25	2	92.6	124	2	98.4
<i>Escherichia coli</i> (wecA)	25	0	100	121	7	94.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (khe)	9	2	81.8	140	2	98.6
<i>Streptococcus agalactiae</i> (cfb)	9	0	100.0	143	1	99.3
Overall	146	7	95.4	744	21	97.3

¹True-negative results were calculated for each species based on the 153 single-infected samples tested in the “double-blind randomized” molecular assay.

In a previous study, it was determined that adding *Lactobacillus* spp. to milk samples could dislodge *Staph. aureus* from the cream fraction of milk and generate more productive data (Graber et al., 2007). In the present study, different concentrations of *L. rhamnosus* were spiked in mastitic milk samples. Although the presence of *L. rhamnosus* did not improve *Staph. aureus* detection or bacterial displacement from the fat layer (data not shown), the addition of this species to milk samples prior to extraction was useful for optimization and the detection of false-negative results, interpreted as PCR inhibition or pellet loss.

Microbiological False-Negative Results Highlighted by Molecular Detection

Whenever a false-positive result was obtained by molecular detection, the corresponding milk samples were further analyzed on selective media to isolate the species that could explain the molecular result. For 6 false-positive results associated with *Staph. aureus*, this methodology led to isolation of the putative *Staph. aureus* pathogen in milk; the identity of that pathogen was then confirmed by sequencing, morphology, and biochemical characteristics (catalase- and coagulase-positive test results). Six of the samples initially identified as single-infected, 4 as positive for *Strep. dysgalactiae* and 2 as positive for *Strep. uberis*, were effectively identified as dual-infected. This highlights the fact that microbiological identification generated 6 false-negative *Staph. aureus* results. Considering these 6 results, the PCR-based diagnostic specificity for *Staph. aureus* detection was revised from 90.1 to 96.0%.

One similar case with an apparent false-positive *E. coli* result for a clinical dual-infected sample was reported, having been bacteriologically diagnosed as *Strep. dysgalactiae* and *Staph. aureus*. This milk sample was streaked on MacConkey agar, and the presence of lactose-positive colonies combined with 16S rRNA sequencing confirmed the presence of *E. coli* in this sample.

Multiplex PCR Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis

Primers amplifying the IS900 gene used for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) were tested on milk samples collected from 29 clinically infected cows whose infection status was confirmed by ELISA, culturing, and PCR-based analysis of the feces. Chelex PCR-based analysis of milk samples from the 29 MAP-positive cows did not generate PCR amplicons, whereas a positive signal was detected by standard PCR using bacterial lysates purified from the respective bacterial culture (data not shown).

DISCUSSION

This study is the first to report a high-throughput multiplex PCR analysis of raw milk without any bacterial enrichment. The results showed a high diagnostic sensitivity of 95.4% and an overall diagnostic specificity of 97.3%. Bacterial species were selected on the basis of their prevalence in Canadian dairy herds (Olde Riekerink et al., 2008) and the severity of the symptoms that they cause. Even though more

recent literature suggests that coagulase-negative staphylococci can also be the causative agent of mastitis cases, CNS was only found in six among the 172 cases selected based on mastitis clinical signs, which might explain the low prevalence of CNS in the present study. The uncertainty of this question (detection in milk with and without mastitis) and the difference into the analytical approach (intergenic fragment fingerprint) (Supre et al., 2009) limited the molecular design to the prevalent and well-defined pathogens found in clinical milk.

The main goal of the assay was to detect the most prevalent mastitis-causing species found in raw milk without the time-consuming and biased enrichment step. The enrichment step may, however, be required for pathogens present in low abundance, as in the case of mycoplasma mastitis (Biddle et al., 2003) or bovine paratuberculosis infections (Giese and Ahrens, 2000), mainly because those pathogens are found in milk in very low amounts (<100 cfu/mL). Because the multiplex PCR assay is based on the identification of bacterial DNA, it is dependent neither on bacterial viability. The analysis could be integrated into milk monitoring schemes using bronopol-preserved milk. Using the proposed protocol, the results were reported within the same working day: genomic DNA was extracted from raw milk within 2 h, followed by the multiplex PCR assay (3 h) and the fragment length analysis by capillary electrophoresis (30 min per sample, 32 samples per hour for the 16-capillary detection system). The common methods used for DNA purification involve a corrosive and toxic organic solvent, such as phenol (Tan and Yiap, 2009). Thus, organic liquid-liquid phase handling, high-salt precipitation, and alcohol precipitation are to be avoided because of poor feasibility, given that the high-throughput analysis

is inappropriate when working with 96- or 384-well plates. Other methods involve column-based purification systems, which are less suitable for high-throughput analysis than magnetic bead-based methods (Siddiqui et al., 2009; Tan and Yiap, 2009). Spin column-based purification is also incompatible with some mastitic milk. There is huge variance in the physical appearance of mastitic milk samples, and the formation of clogs hinders the use of columns (data not shown). Focusing on simple milk separation processes makes it possible to work safely and properly in multi-well plates without significantly affecting the amplifiable DNA yield. An additional advantage concerns the economical aspect of the method. The overall reagent cost per 7-species analysis is less than US\$5 per milk sample.

Moreover, the multiplex PCR assay is flexible. For example, the gene *sua* (Luther et al., 2008) was also validated for all *Strep. uberis* isolates (data not shown) and could therefore have replaced *pauA* in the multiplex PCR assay (data not shown). Primer sets specific to virulence factors of interest (e.g. beta-lactam) could also be considered in the detection assay. In addition, another detection scheme could be combined within the multiplex PCR assay, such the fingerprinting of the RNA-intergenic spacer sequence (i.e. tDNA-PCR) for the detection of coagulase-negative staphylococci because both are based on the capillary electropherogram profile (Supre et al., 2009).. This DNA sequence-based species identification method using capillary electrophoresis is currently the most accurate species identification method available (Zadoks and Watts, 2009). In contrast to the real-time PCR assay, the different fragment length analyses combined with the numerous fluorescent dyes in multiplex PCR amplify the detection capacity of the assay. The introduction of additional

pathogens or virulence factors into the detection system is thus a matter of design, namely discrimination based on both amplicon length and the 4 fluorescent dyes. The PCR-based scheme presented here is the basis for a field performance trial that is economically viable because it also presents the advantage of automatic extraction and detection procedures. Assuming that proper equipment is in place, this approach could be used in any routine bacteriological laboratory, regardless of the operators' experience.

The robustness of the Chelex boiling extraction and PCR-based detection procedure was shown by the microbiological false-negative results revealed by molecular detection of 6 cases associated with *Staph. aureus*. The overgrowth of some pathogens can mask the detection of others and thus bias the microbiological analysis. This fact has been highlighted by the molecular detection of *Staph. aureus*, which had not been found during the first microbiological analysis but was later detected by specific culture and confirmed by sequencing the intergenic ribosomal gene. Although an inherent proportion of false-positive results is obtained when clinical samples are analyzed, the occurrence of false positives for the major mastitis pathogens was relatively low with the proposed approach compared to other methods. For instance, microarray analysis using 16S ribosomal hybridization probes generated a higher proportion of false-positive results (10 per 50 clinical milk samples) (Cremonesi et al., 2009).

The extraction and detection method devised in the present study is reproducible and has been successfully challenged with raw milk samples spiked with different pathogens. The sensitivity was as low as 100 to 500 cfu/mL for the 6 most

prevalent mastitis pathogens tested using the spiked-milk method. The sensitivity is similar to that reported in other research. For example, EDTA/SDS-based extraction methods performed following pronase enzymatic digestion with an overnight TSB enrichment step showed sensitivity of 100 to 1,000 cfu/mL for *Staph. aureus*, *Strep. uberis*, and *Strep. agalactiae* (Gillespie and Oliver, 2005); the sensitivity for *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* without preculture was 200 cfu/mL (Grattepanche et al., 2005). However, extraction protocols using organic solvent and Triton X-100 achieved greater sensitivity, with detection of 10 cfu/mL for *Staph. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, and *Strep. uberis* (Cremonesi et al., 2006) and for *Shigella* and *E. coli* (Riyaz-Ul-Hassan et al., 2009). Commercial PCR-based milk analyses are available, but their sensitivity is limited. For example, the PathoProof Mastitis PCR Assay (Finnzymes Oy, Espoo, Finland) achieved a much lower sensitivity, from 2,230 to more than 10^7 bacterial genome copies per 1 mL milk (Taponen et al., 2009). Furthermore, the PathoProof assay involves a real-time PCR approach for which the number of detected bacterial species is limited to 4 targets per PCR assay because of the respective spectra of the combined fluorescent dyes, which cannot overlap for specific detection. This commercial detection assay is performed using spin columns, which the authors of the present study found to be incompatible with physically altered mastitic samples (data not shown). The sensitivity is thus much less than the conventional microbiological analysis, for which the detection limit on Petri dishes is 10 cfu using 100, which corresponds to a concentration of 100 cfu/mL milk. The Chelex boiling extraction method combined with PCR-based fluorescent detection thus achieved interesting sensitivity that ranged from 100 to

500 cfu in 1 mL milk. Detection is limited, however, to the volume used for the PCR assay. In the present assay, the volume was limited to 2 μ L from the 200- μ L extract, equivalent to 1:100 of 1 mL milk as the starting material. For a given analytical specificity of 500 cfu/mL, it corresponds to 5 genome equivalents in the PCR assay. Indeed, a 2- μ L extract used in PCR would correspond to 5 genome equivalents given that 500 cfu is resuspended into the 200- μ L extract (2.5 cfu/ μ L). Whereas one substantial benefit of a PCR assay over conventional microbiological detection can be achieved with frozen sample with bacterial viability lost (Schukken et al., 1989), this molecular technique depends on the number of genomic DNA-cfu equivalents put into the PCR assay as well as the impact of contaminants that could inhibit subsequent PCR reactions. The Chelex boiling extraction method is relatively clean and effective for detecting as few as 5 genome equivalents per PCR reaction.

The bacterial DNA extraction procedure was a main focus in the present study because many reports proposing a molecular method underestimated this former step for molecular detection (Brehm-Stecher et al., 2009). The extraction was designed to meet the study's main criteria (low cost, high throughput capacity, and good sensitivity). During the optimization step, several constraints linked to the physical and biochemical aspects of milk were encountered. The first significant aspect was the addition of Tergitol, a detergent that liquefies the fat layer. The addition of a detergent increased the fluidity of the fat layer to some extent, preventing it from sticking to the walls of the tube during decantation. Other works proposed the use of detergent solutions, with Triton X-100 being the most frequently used (Hotzel et al., 1996; Champagne et al., 1997; Muramatsu et al., 1997; O'Mahony and Hill, 2004;

Cremonesi et al., 2006). However, Tergitol detergent was chosen because of its inability to lyse Gram-negative cell walls, as shown elsewhere (Mayrl et al., 2009). Eliminating the fat layer, proteins, and calcium ions was the next step towards obtaining DNA suitable for the downstream PCR reaction. PCR inhibition is certainly an issue of great concern when working with samples purified from milk. To trap divalent ions, the addition of EDTA and the Chelex resin were definitely effective for the isolation of coarse, relatively clean, amplifiable DNA from mastitic samples. Rapid DNA extraction using a Chelex-based agent has also been found to be successful for detecting pathogens in milk (Minarovičová et al., 2010). It appears that EDTA destabilizes casein micelles by calcium ion deprivation (Grattepanche et al., 2005), which might reduce micelle precipitation during centrifugation. EDTA treatment was generally sufficient and left a thin pellet. For mastitic samples presenting abundant clots and flakes, however, these physical alterations of milk are challenging for DNA extraction procedures, especially ones designed for high-throughput applications. The principle based on unspecific capture of bacteria to ligand-coated magnetic particles and subsequent binding of the bacterial DNA to the same bead surface (Rudi et al., 1998; Tan and Yiap, 2009) has proven useful for the molecular diagnosis of bacterially derived diseases (Angles d'Auriac et al., 2007), including mastitis (present study). The GenFind V2 DNA purification protocol greatly improved PCR detection, as was the case, for example, with some milk samples that had been stored for years (data not shown). The GenFind protocol worked with a 96-well plate and was thus well adapted for high-throughput clinical sample analysis.

In conclusion, the authors are confident that the proposed approach is specifically adapted for high-throughput analysis and shows excellent analytical specificity and sensitivity. Although some constraints were imposed on the extraction and detection protocol (no organic solvents or hazardous chemicals), the motivation behind its development was also to keep the cost of the methodology as low as possible (less than US\$5) in order to open it up to large-scale analysis for mastitis diagnosis. The proposed Chelex–PCR-based approach presents numerous technical benefits that make it appropriate for the implementation of PCR assays in routine mastitis-testing programs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Dairy Cattle Genetics Research and Development (DairyGen) Council and from Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), as well as by master's and doctoral scholarships awarded under the Canadian Dairy Commission scholarship program in collaboration with Novalait inc. The authors would like to thank the following individuals: Jessika St-Pierre and Catherine Thibault (AAFC) for providing technical assistance in gene target selection and microbiological analysis during the preliminary experiments; Serge Messier (clinical bacteriology laboratory, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal) and Doris Poole (Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island) for providing the mastitic samples and Ruth N. Zadoks (Department of Food

Science and Quality Milk Production Services, Cornell University) for providing expertise in epidemiology and bacteriology.

APPENDIX

Supplementary Table 1. Primers and dyes used for multiplex PCR

Species	Gene/Target	Sequence 5'-3' forward and reverse primers	Amplicon size (bp)	Concentration (μM)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ¹	<i>fbp</i>	NED-TGCTGCTGGATAAGTTAGCTCCG GAAATTGCCATCTTCATCAACCG	281	0.20
<i>Escherichia coli</i> ²	<i>wecA (rfe)</i>	PET-GTGGTTCGACGGGCAAACCAGCCTC CGACGGTACATAATCGCCACCATAT	264	0.28
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ³	16S–23S intergenic region	6FAM-TGGAACACGTTAGGGTCG AACTAGAAAACTCTTGATTATTC	256	0.28
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁴	<i>nuc</i>	VIC- TCACAAACAGATAACGGCGTAAATAG CACTTGCTTCAGGACCATATTTCTC	235	0.20
<i>Streptococcus agalactiae</i> ⁵	<i>cfb</i>	NED- CGACCTTTTGGACAAGTAGTAAGATACC GGAGTTGTCACTTGATCAGCATGTAC	199	0.28
<i>Streptococcus uberis</i> ⁶	<i>pauA</i>	VIC-CACAATTATTAACACGAGATCGACG TCAGTAGGATGAGTGATAGGTTCTTCA	151	0.10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ⁸	<i>khe</i>	PET-GGAAGTGTGGATAAACGGCT CTCCTGCTCGGTGTTATTGA	109	0.10

¹Specific to the fructose-1,6-bisphosphatase (*fbp*) gene (Roy and Ward, 2004); PCR fragment complement of nt 1034 to 1314 of GenBank accession No. AY572945.

- ²Specific to the undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase (*rfe* alias *wecA*) gene (DebRoy and Roberts, 2006); PCR fragment complement of nt 3996859 to 3997122 of GenBank accession No. NC_009800.
- ³Specific to the 16S–23S rDNA intergenic spacer region (Hassan et al., 2002); PCR fragment complement of nt 8 to 263 of GenBank accession No. U39767.
- ⁴Specific to the thermonuclease precursor (*nuc*) gene (Graber et al., 2007); PCR fragment complement of nt 825087 to 825321 of GenBank accession No. NC_007622.
- ⁵Specific to the CAMP factor (*cfb*) gene (Gillespie and Oliver, 2005); PCR fragment complement of nt 216 to 414 of GenBank accession No. X72754.1.
- ⁶Specific to the plasminogen activation (*pauA*) gene (Gillespie and Oliver, 2005); PCR fragment complement of nt 422 to 572 of GenBank accession No. AJ012549.
- ⁷Specific to the hemolysin (*khe*) gene (Yin-Ching et al., 2002); PCR fragment complement of nt 318 to 426 of GenBank accession No. AF293352.

Supplementary Table 2. Negative control species

Species	Source	Strain
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	AVC ¹	Unknown
<i>Aerococcus viridans</i>	CHUS ²	SPQ 3414
<i>Aerococcus viridans</i> type1	DFSCU ³	Z3-042
<i>Aerococcus viridans</i> type1	DFSCU	Z3-041
<i>Aerococcus viridans</i> type1	DFSCU	Z3-038
<i>Aerococcus viridans</i> type2	DFSCU	Z3-037
<i>Aerococcus viridans</i> type2	DFSCU	Z3-153
<i>Aerococcus viridans</i> type2	DFSCU	Z3-148
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AVC	Unknown
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	AVC	Unknown
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC ⁴	14579
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	6051
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	ATCC	43734
<i>Enterobacter agglomerans</i>	AVC	Unknown
<i>Enterococcus durans</i>	ATCC	19432
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	19433
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC	29212
<i>Enterococcus faecium</i>	FMVUM ⁵	HA-56038
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC	19434
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC	19119
<i>Listeria monocytogenes</i>	CHUS	89-DD-20
<i>Listeria monocytogenes</i>	AVC	Unknown
<i>Mycoplasma bovis</i>	ATCC	19852
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	ATCC	27748
<i>Mycoplasma canadense</i>	ATCC	29418
<i>Pasteurella multocida</i>	CHUS	Clinical specimen
<i>Proteus mirabilis</i>	US ⁶	API-74-36
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC	33420
<i>Prototheca wickerhamii</i>	CHUS	Clinical specimen
<i>Prototheca zopfii</i>		Unknown
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	9027
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC	13525
<i>Pseudomonas putida</i>	AVC	Unknown
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC	17588
<i>Raoultella planticola</i>	ATCC	33531
<i>Salmonella enteritidis</i>	AVC	Unknown
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC	14028
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC	29635
<i>Shigella boydii</i>	DFSCU	S1-004
<i>Shigella flexneri</i>	DFSCU	S1-002
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC	29930
<i>Shigella sonnei</i>	DFSCU	S1-003

<i>Staphylococcus chromogenes</i>	DFSCU	CH1
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	DFSCU	CH80
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC	12228
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CHUS	Clinical specimen
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DFSCU	2-1-2-1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC	29970
<i>Staphylococcus hyicus</i>	AVC	Unknown
<i>Staphylococcus intermedius</i>	ATCC	29663
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	CHUS	Clinical specimen
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	US	Unknown
<i>Staphylococcus simulans</i>	US	Unknown
<i>Staphylococcus xylosus</i>	AVC	Unknown
<i>Streptococcus acidominimus</i>	FMVUM	ss1019
<i>Streptococcus canis</i>	CHUS	CAP MB 867
<i>Streptococcus equisimilis</i>	ATCC	35666
<i>Streptococcus parauberis</i>	ATCC	13386
<i>Streptococcus salivarius</i>	CHUS	Clinical specimen
<i>Streptococcus salivarius</i>	DFSCU	S3-178
<i>Streptomyces griseus</i>	DFSCU	2-1-3-44
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC	23715

¹AVC: Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island,

Charlottetown, Canada.

²CHUS: Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, QC, Canada.

³DFSCU: Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, NY, USA.

⁴ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.

⁵FMVUM: Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada.

⁶US: Département de Biologie, Université de Sherbrooke, QC, Canada.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le travail présenté dans ce mémoire présente une nouvelle méthode de détection moléculaire des principaux pathogènes majeurs causant des infections intramammaires menant à la mammite chez les bovins laitiers. Cette méthode a été mise au point en répondant aux critères fixés initialement : sensibilité appropriée, capacité de transfert à haut débit et coût raisonnable. Nous pensons qu'une approche d'identification moléculaire pourrait être d'une grande utilité pour le diagnostic de la mammite pour les raisons qui seront évoquées.

L'utilisation d'un contrôle d'extraction par l'ajout de *Lactobacillus rhamnosus* dans les échantillons se révèle comme un atout majeur pour ce travail. D'autres études proposant des applications de diagnostic moléculaire à partir d'échantillons de lait n'utilisent généralement qu'un contrôle positif simplement d'amplification constitué d'ADN plasmidique (GRABER *et al.* 2007) ou d'un fragment d'ADN double brin (KOSKINEN *et al.* 2009). Bien que ces contrôles internes permettent effectivement de vérifier si l'étape d'amplification s'est déroulée correctement, ils ne donnent aucune information sur l'intégrité de l'étape d'isolement de l'ADN génomique bactérien. Avec le système proposé dans ce mémoire, une quantité connue de *Lactobacillus rhamnosus* est ajoutée à chacun des échantillons de lait ce qui en fait à la fois un contrôle d'extraction de l'ADN et d'amplification puisque des amorces amplifient une région génique spécifique à cette espèce. *L. rhamnosus* est donc

considéré comme traceur d'efficacité d'extraction de bactéries d'un échantillon de lait brut et valide le potentiel d'amplification par la PCR de l'ADN extrait.

Il semble y avoir un retard dans l'application des méthodes de détection moléculaire dans l'industrie laitière. Le diagnostic moléculaire n'est toujours pas intégré à l'analyse mensuelle du lait, non plus à grande échelle dans les champs d'application en médecine humaine. Paradoxalement, le nombre de travaux présentant diverses méthodes moléculaires de détection de pathogènes dans ces champs d'application est considérable. Plusieurs raisons pourraient expliquer pourquoi la microbiologie n'a pas encore été détrônée de son statut de « gold standard » pour la détection d'espèces vivantes. Il sera donc question de certaines d'entre elles dans les paragraphes suivants.

Un des éléments les plus importants freinant la propagation des méthodes de détection moléculaire dans les laboratoires de diagnostic routinier est probablement les restrictions imposées par l'utilisation de ces méthodes dans des contextes cliniques. Effectivement, les échantillons biologiques à analyser peuvent contenir de nombreuses composantes hautement incompatibles avec l'amplification d'ADN. Par exemple, le sang (hémoglobine) est connu pour inhiber la PCR (WILSON 1997; AL-SOUD et RADSTROM 2001). Le lait utilisé dans le travail présent en est un très bon exemple : il contient notamment des quantités importantes d'ions calcium ainsi que des protéines et des matières grasses en plus d'altérations macroscopiques rendant l'échantillon définitivement hétérogène. Ces différents éléments nécessitent, tel que discuté, l'utilisation d'une étape permettant l'isolement des cellules contenant l'ADN

à amplifier qui élimine également les inhibiteurs de la PCR (BICKLEY *et al.* 1996). Or, une telle adaptation dans un protocole d'extraction d'ADN peut nuire à la reproductibilité des résultats en augmentant la variabilité inter essais. L'influence de cette étape est importante puisque les biologistes moléculaires sont davantage habitués à travailler à partir de matériel entièrement compatible avec l'étape de la PCR. Or, ce n'est que rarement le cas pour des échantillons prélevés directement de tissu ou de matériel biologique à des fins d'analyse.

Deuxièmement, les coûts liés à l'utilisation d'applications de diagnostic moléculaire constituent un autre aspect important freinant leur utilisation. Lorsqu'elles sont à leur stade de développement et de mise au point, les coûts ne sont que rarement discutés dans les articles scientifiques décrivant le développement d'applications diagnostiques. De ce point de vue, les méthodes de détection microbiologiques sont très souvent avantageuses, se basant principalement sur des milieux de culture et des réactions biochimiques peu coûteuses. D'un autre côté, les étapes d'amplification et de détection moléculaires utilisent souvent des systèmes propriétaires aux coûts élevés. De plus, elles nécessitent un appareillage exigeant un montant initial important. L'investissement économique requis pour l'appareillage est un élément supplémentaire limitant l'implantation routinière de ces pratiques malgré leurs avantages visibles dans des démonstrations de recherche fondamentale.

Troisièmement, il est difficile d'établir une méthode d'extraction générique fructueuse pour un large spectre de microorganismes. L'étape de l'extraction de l'ADN

génomique bactérien a toujours été un casse-tête en vue de l'utilisation du diagnostic moléculaire lorsque des bactéries à Gram positif et des mycobactéries sont la cible des applications (RANTAKOKKO-JALAVA et JALAVA 2002). Il est effectivement nécessaire de lyser correctement la paroi cellulaire bactérienne afin de pouvoir récupérer l'ADN génomique qui est subséquemment amplifié. La plupart des protocoles d'extraction d'ADN développés ont recours à des solvants pour lyser la paroi bactérienne des microorganismes à Gram négatif. Or, d'autres espèces bactériennes visées par les applications de diagnostic moléculaire nécessitent une adaptation du protocole d'extraction d'ADNg selon les caractéristiques de leur membrane cellulaire, notamment par l'utilisation d'enzymes (BREHM-STECHER *et al.* 2009).

Il est possible d'imaginer que, dans un futur rapproché, les échantillons de lait récoltés mensuellement dans les troupeaux québécois serviront non seulement au dosage de cellules somatiques et des constituants (gras, protéine) mais également à la détection systématique de bactéries. La possibilité d'adapter la méthode présentée dans cet ouvrage à un système automatisé à haut débit ainsi que l'option d'archiver les résultats font de cette approche une méthode ayant un potentiel réel pour la détection de pathogènes dans les échantillons de lait provenant de troupeaux laitiers. Ces résultats permettront de rapidement mettre en lumière un foyer d'infection et d'apporter les correctifs requis. Ceux-ci incluent la décision d'utiliser une antibiothérapie appropriée, d'attendre une guérison naturelle, de procéder à la réforme ou la mise en quarantaine de l'animal. L'antibiothérapie utilisée actuellement dans l'industrie

laitière se résume généralement à l'administration d'antibiotiques selon le statut de Gram présumé du microorganisme. Ainsi, les antibiotiques contenant un noyau β -lactame sont utilisés pour les bactéries à Gram positif alors que pour les bactéries à Gram négatif, les amphénicols et les aminoglycosides constituent des choix populaires. À long terme, l'utilisation inefficace d'antibiotiques serait diminuée au sein d'un troupeau qui se verrait proposer des modifications plus appropriées dans sa régie. Afin d'y parvenir, les méthodes de détection moléculaire doivent être réellement adaptées aux besoins des producteurs laitiers. Le coût du test est sans aucun doute l'élément déterminant pour mettre en application son utilisation. Afin de réduire les coûts au minimum, des sacrifices techniques doivent être faits au niveau de la méthodologie. Bien qu'il soit de nature scientifique de vouloir atteindre une performance optimale, si ces sacrifices n'ont que de faibles conséquences sur la sensibilité et la spécificité finale du test, l'approche ici proposée apportera tout de même une contribution notable à la gestion de la mammite.

L'outil diagnostique présenté dans ce mémoire permet la détection de la plupart des pathogènes importants responsables de cas d'infections intra mammaires tels qu'ils ont été présentés dans l'introduction. La principale exception concerne la famille des *Staphylococci* à coagulase négative qui n'est pas détecté par le test développé. La description de cette famille de microorganismes permet de constater qu'une certaine controverse existe à propos de leur capacité à infecter la glande mammaire et induire un épisode de mammite sans qu'un des pathogènes majeurs présentés ne soit présent préalablement. Une étude récente démontre que 31% des souches de

CNS expriment des entérotoxines staphylococcales normalement retrouvées chez *Staphylococcus aureus* (PARK *et al.* 2010). Suite à cette observation, il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que les symptômes associés à une infection intramammaire causée par des CNS sont reliés à la capacité de ces bactéries à exprimer ces facteurs de virulence. Ainsi, la solution la plus simple pour détecter les souches les plus dangereuses pour les troupeaux laitiers serait de cibler les gènes exprimant ces entérotoxines (OTTO 2004). En utilisant la méthodologie détaillée dans ce mémoire, il devient maintenant facile d'ajouter à la liste des gènes ciblés les facteurs de virulence les plus fréquents ou importants en rajoutant des amorces amplifiant ces gènes aux autres amorces déjà utilisées lors de l'étape de multiplex-PCR. Il serait ainsi possible de cibler les souches de CNS ayant la plus grande capacité à causer des mammites cliniques tout en conservant un certain niveau de discrimination envers les souches avirulentes afin d'éviter d'obtenir trop de résultats positifs injustifiés. Je pense que cette solution représente un bon compromis pour inclure les CNS dans la liste des espèces pouvant être détectées par le test malgré que certaines souches généreront des résultats faussement négatifs.

Dans le même ordre d'idée, il pourrait être intéressant d'exploiter davantage les capacités d'un tel système de détection pour cibler des gènes de résistance aux antibiotiques. Effectivement, en plus d'aider au diagnostic de l'agent causal de la mammite, il serait ainsi possible de faciliter la prise de décisions pour traiter l'infection. Bien que les problèmes de pathogènes résistants aux antibiotiques soient beaucoup moins graves chez les bovins que pour la médecine humaine, ces cas

nuisent à la guérison des cas de mammite. De plus, ils engendrent des dépenses supplémentaires en raison d'une antibiothérapie inefficace sans compter le risque de transfert horizontal des gènes de résistances à des souches infectant l'humain (e.g. souches nosocomiales) (OPPEGAARD *et al.*, 2001). Le gène de résistance des plus intéressant à cibler serait probablement *mecA* et *bla* qui sont les gènes de résistance aux antibiotiques de type β -lactames chez *Staphylococcus aureus* (WIELDERS *et al.*, 2002).

Finalement, le système de diagnostic moléculaire proposé a été testé à l'aide d'échantillons de lait provenant à la fois de contamination naturelle, c'est-à-dire de cas de mammites cliniques, et de contamination artificielle. Les résultats obtenus sont intéressants et encourageants, permettant d'entrevoir l'analyse d'autres types d'échantillons pour vérifier davantage les capacités du test développé dans les troupeaux laitiers. Parmi ceux-ci, une banque d'échantillons provenant de cas de mammite mais n'ayant pas généré de croissance microbiologique et des échantillons de lait sains pourraient servir à corroborer la spécificité et la sensibilité décrite dans ces travaux. Ainsi, des échantillons générant des résultats négatifs par microbiologie (sans croissance bactérienne) peuvent être utilisés pour évaluer davantage la sensibilité diagnostique. Des échantillons de lait sains, quant à eux, servent à évaluer la spécificité diagnostique qui est optimale lorsque les résultats seront négatifs avec les deux systèmes testés en parallèle déterminé notamment par l'absence de croissance bactérienne et de signal moléculaire.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre. Nathalie Bissonnette, qui m'a tout d'abord donné la chance de réaliser ma maîtrise au sein de son laboratoire. Elle a su me faire profiter de sa vaste expérience pour mener à terme ce projet et je peux affirmer que sa compréhension et sa vivacité d'esprit en font une directrice de recherche hors-pair. Travailler au sein de l'équipe de recherche a été largement facilité par l'aide de Catherine Thibault qui est à la fois une excellente assistante de recherche et une collègue de travail des plus agréables à côtoyer. Dans le laboratoire, je suis content d'avoir pu côtoyer Karin, Pierre-Luc et Weena. J'ai également rencontré de nombreuses personnes du centre de recherche et développement sur le bovin laitier et le porc de Lennoxville qui rendaient la vie sociale et culturelle très intéressante ainsi que tous les bons amis que j'ai eu pendant ces années. Je tiens à remercier mes parents, mon frère et ma sœur qui m'ont toujours supporté pour tous les choix que j'ai fait et m'ont aidé à continuer à faire ce que j'aime. Finalement, je remercie également ma copine, qui a su être patiente et attentive tout en m'aidant à garder le moral et le sourire.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ahmadzadeh, A., Frago, F., Shafii, B., Dalton, J. C., Price, W. J. et McGuire, M. A. (2009). "Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows." Animal reproduction science **112**(3-4): 273-282.
- Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A. A., Lammler, C., Wolter, W. et Zschock, M. (2001). "Toxin genes and other characteristics of Staphylococcus aureus isolates from milk of cows with mastitis." Clinical and diagnostic laboratory immunology **8**(5): 959-964.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. et Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." Journal of molecular biology **215**(3): 403-410.
- Bar, D., Tauer, L. W., Bennett, G., Gonzalez, R. N., Hertl, J. A., Schukken, Y. H., Schulte, H. F., Welcome, F. L. et Grohn, Y. T. (2008). "The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming." Journal of dairy science **91**(6): 2205-2214.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. et Sayers, E. W. (2010). "GenBank." Nucleic acids research **38**(Database issue): D46-51.
- Bergdoll, M. S. (1989). "Staphylococcus aureus." Foodborne bacterial pathogens / edited by Michael P. Doyle. Foodborne bacterial pathogens / edited by Michael P. Doyle.: 463-523.
- Bickley, J., Short, J. K., McDowell, D. G. et Parkes, H. C. (1996). "Polymerase chain reaction (PCR) detection of Listeria monocytogenes in diluted milk and

- reversal of PCR inhibition caused by calcium ions." Letters in applied microbiology **22**(2): 153-158.
- Biddle, M. K., Fox, L. K. et Hancock, D. D. (2003). "Patterns of mycoplasma shedding in the milk of dairy cows with intramammary mycoplasma infection." Journal of the American Veterinary Medical Association **223**(8): 1163-1166.
- Biddle, M. K., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gaskins, C. T. et Evans, M. A. (2004). "Effects of storage time and thawing methods on the recovery of Mycoplasma species in milk samples from cows with intramammary infections." Journal of dairy science **87**(4): 933-936.
- Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E. et Green, M. J. (2007). "Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales." The Veterinary record **160**(8): 253-257.
- Brehm-Stecher, R., Young, C., Jaykus, L. A. et Tortorello, M. L. (2009). "Sample preparation: the forgotten beginning." J Food Prot **72**(8): 1774-1789.
- Brown, J., Farnsworth, R., Wannamaker, L. W. et Johnson, D. W. (1974). "CAMP factor of group B streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows." Infection and immunity **9**(2): 377-383.
- Bruhn, J.B., Vogel, B.F. et Gram, L. (2005). "Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont selective enrichments." Appl Environ Microbiol **71**(2): 961-967.

- Calvinho, L. F., Almeida, R. A. et Oliver, S. P. (1998). "Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis." Veterinary microbiology **61**(1-2): 93-110.
- Castiglioni, B., Rizzi, E., Frosini, A., Sivonen, K., Rajaniemi, P., Rantala, A., Mugnai, M. A., Ventura, S., Wilmotte, A., Boutte, C., Grubisic, S., Balthasart, P., Consolandi, C., Bordoni, R., Mezzelani, A., Battaglia, C. et De Bellis, G. (2004). "Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria." Applied and Environmental Microbiology **70**(12): 7161-7172.
- Christen, A.-M. (2009). Une cueillette fructueuse, des données prometteuses. Le producteur de lait québécois. **Septembre**: 24.
- Clark, D. L., Jr., Koziczowski, J. J., Radcliff, R. P., Carlson, R. A. et Ellingson, J. L. (2008). "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction." Journal of dairy science **91**(7): 2620-2627.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M. et Tiedje, J. M. (2009). "The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis." Nucleic acids research **37**(Database issue): D141-145.
- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S. et Luzzana, M. (2006). "Technical note: Improved method for

- rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk." Journal of dairy science **89**(1): 163-169.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Castiglioni, B., Luzzana, M., Battaglia, C., Sartorelli, P. et Moroni, P. (2008). "Development of a microarray platform for detection of milk pathogens: Preliminary results." Veterinary Research Communications **32**(SUPPL. 1).
- Cremonesi, P., Pisoni, G., Severgnini, M., Consolandi, C., Moroni, P., Raschetti, M. et Castiglioni, B. (2009). "Pathogen detection in milk samples by ligation detection reaction-mediated universal array method." Journal of Dairy Science **92**(7): 3027-3039.
- Croxen, M. A. et Finlay, B. B. (2010). "Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity." Nature reviews. Microbiology **8**(1): 26-38.
- Day, S. P., Hudson, A., Mast, A., Sander, T., Curtis, M., Olson, S., Chehak, L., Quigley, N., Ledford, J., Yen-Lieberman, B., Kohn, D., Quigley, D. I. et Olson, M. (2009). "Analytical performance of the Investigational Use Only Cervista HPV HR test as determined by a multi-center study." Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology **45 Suppl 1**: S63-72.
- De Vliegher, S., Zadoks, R. N. et Barkema, H. W. (2009). "Heifer and CNS mastitis." Vet Microbiol **134**(1-2): 1-2.
- Detilleux, J. C. (2009). "Genetic factors affecting susceptibility to udder pathogens." Veterinary microbiology **134**(1-2): 157-164.

- Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R. A., Oliver, S. P., Simpson, K. et Schukken, Y. H. (2006). "Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis." Veterinary microbiology **116**(4): 270-282.
- Dunbar, J., White, S. et Forney, L. (1997). "Genetic Diversity through the Looking Glass: Effect of Enrichment Bias." Appl Environ Microbiol **63**(4): 1326-1331.
- Durocher, J. et Martin, R. (2009). Un coup d'oeil sur la réforme. Le producteur de lait québécois. **Mai**: 48.
- Ericsson Unnerstad, H., Lindberg, A., Persson Waller, K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M. et Bengtsson, B. (2009). "Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors." Veterinary microbiology **137**(1-2): 90-97.
- Erskine, R., Cullor, J., Schaellibaum, M., Yancey, B. et Zecconi, A. (2004). Bovine Mastitis Pathogens and Trends in Resistance to Antibacterial Drugs. NMC Annual Meeting Proceedings, p.400-403
- Facklam, R. (2002). "What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes." Clinical microbiology reviews **15**(4): 613-630.
- Fantelli, K. et Stephan, R. (2003). "[Validation of DNase reaction for identification of *Staphylococcus aureus* strains in routine mastitis diagnosis]." Schweizer Archiv fur Tierheilkunde **145**(2): 76-79.
- Ferguson, J. D., Azzaro, G., Gambina, M. et Licitra, G. (2007). "Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006." Journal of dairy science **90**(12): 5798-5813.

- Fox, P. F. et McSweeney P. L. H. (1998). **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, London.
- Gerry, N. P., Witowski, N. E., Day, J., Hammer, R. P., Barany, G. et Barany, F. (1999). "Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations." Journal of Molecular Biology **292**(2): 251-262.
- Giese, S. B. et Ahrens, P. (2000). "Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk from clinically affected cows by PCR and culture." Veterinary microbiology **77**(3-4): 291-297.
- Gillespie, B. E. et Oliver, S. P. (2005). "Simultaneous detection of mastitis pathogens, Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, and Streptococcus agalactiae by multiplex real-time polymerase chain reaction." Journal of dairy science **88**(10): 3510-3518.
- Giraffa, G., Rossetti, L. et Neviani, E. (2000). "An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria." Journal of Microbiological Methods **42**(2): 175-184.
- Graber, H. U., Casey, M. G., Naskova, J., Steiner, A. et Schaeren, W. (2007). "Development of a highly sensitive and specific assay to detect Staphylococcus aureus in bovine mastitic milk." Journal of dairy science **90**(10): 4661-4669.
- Grattepanche, F., Lacroix, C., Audet, P. et Lapointe, G. (2005). "Quantification by real-time PCR of Lactococcus lactis subsp. cremoris in milk fermented by a mixed culture." Appl Microbiol Biotechnol **66**(4): 414-421.

- Harmon, R. J. (1996). "Controlling contagious mastitis." Retrieved 3 juin, 2010, from <http://www.nmconline.org/articles/contagious.htm>.
- Hassan, A. A., Khan, I. U., Abdulmawjood, A. et Lämmler, C. (2003). "Inter- and intraspecies variations of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of various streptococcal species." Systematic and Applied Microbiology **26**(1): 97-103.
- Hein, I., Jorgensen, H. J., Loncarevic, S. et Wagner, M. (2005). "Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR." Research in microbiology **156**(4): 554-563.
- Heringstad, B., Chang, Y. M., Gianola, D. et Klemetsdal, G. (2004). "Multivariate threshold model analysis of clinical mastitis in multiparous norwegian dairy cattle." Journal of dairy science **87**(9): 3038-3046.
- Hertl, J. A., Grohn, Y. T., Leach, J. D., Bar, D., Bennett, G. J., Gonzalez, R. N., Rauch, B. J., Welcome, F. L., Tauer, L. W. et Schukken, Y. H. (2010). "Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows." Journal of dairy science **93**(4): 1551-1560.
- Hettinga, K. A., van Valenberg, H. J., Lam, T. J. et van Hooijdonk, A. C. (2008). "Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites." Journal of dairy science **91**(10): 3834-3839.
- Hiss, S., Mueller, U., Neu-Zahren, A. et Sauerwein, H. (2007). "Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters." Veterinari Medicina **52**(6): 245-252.

- Hogan, J. S., R. N. Gonzáles, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, and K. L. Smith (1999). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis Madison, WI, Rev. ed. National Mastitis Council.
- Hogan, J. S., Smith, K. L., Hoblet, K. H., Todhunter, D. A., Schoenberger, P. S., Hueston, W. D., Pritchard, D. E., Bowman, G. L., Heider, L. E., Brockett, B. L. et al. (1989). "Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies." Journal of dairy science **72**(1): 250-258.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. et Gelfand, R. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7276-7280.
- Houlihan, M. G., Veenstra, B., Christian, M. K., Nicholas, R. et Ayling, R. (2007). "Mastitis and arthritis in two dairy herds caused by *Mycoplasma bovis*." Veterinary record **160**(4): 126-127.
- Hovinen, M., Siivonen, J., Taponen, S., Hanninen, L., Pastell, M., Aisla, A. M. et Pyorala, S. (2008). "Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera." Journal of dairy science **91**(12): 4592-4598.
- Jasper, D. E. (1982). "The role of *Mycoplasma* in bovine mastitis." Journal of the American Veterinary Medical Association **181**(2): 158-162.
- Ke, D., Menard, C., Picard, F. J., Boissinot, M., Ouellette, M., Roy, P. H. et Bergeron, M. G. (2000). "Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci." Clinical chemistry **46**(3): 324-331.

- Keefe, G. P. (1997). "Streptococcus agalactiae mastitis: a review." Can Vet J **38**(7): 429-437.
- Khare, S., Adams, L. G., Osterstock, J., Roussel, A. et David, L. (2008). "Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of Mycobacterium paratuberculosis." Journal of clinical microbiology **46**(4): 1561-1562.
- Kim, C. H., Khan, M., Morin, D. E., Hurley, W. L., Tripathy, D. N., Kehrli, M., Jr., Oluoch, A. O. et Kakoma, I. (2001). "Optimization of the PCR for detection of Staphylococcus aureus nuc gene in bovine milk." Journal of dairy science **84**(1): 74-83.
- Klei, L., Yun, J., Sapru, A., Lynch, J., Barbano, D., Sears, P. et Galton, D. (1998). "Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality." Journal of dairy science **81**(5): 1205-1213.
- Klungland, H., Sabry, A., Heringstad, B., Olsen, H. G., Gomez-Raya, L., Vage, D. I., Olsaker, I., Odegard, J., Klemetsdal, G., Schulman, N., Vilkki, J., Ruane, J., Aasland, M., Ronningen, K. et Lien, S. (2001). "Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle." Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society **12**(11): 837-842.
- Kluytmans, J., van Belkum, A. et Verbrugh, H. (1997). "Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks." Clinical microbiology reviews **10**(3): 505-520.

- Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S. et Mäntysaari, E. A. (2007). "Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland." Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences **57**(2): 89-96.
- Koskinen, M. T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H. W., Bexiga, R., Roberson, J., Solverod, L., Piccinini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S. et Salmikivi, L. (2009). "Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens." Journal of dairy science **92**(3): 952-959.
- Kovtunovych, G., Lytvynenko, T., Negrutska, V., Lar, O., Brisse, S. et Kozyrovska, N. (2003). "Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene." Res Microbiol **154**(8): 587-592.
- Krömker, V., Paduch, J. H., Klocke, D. et Zinke, C. (2010). "Microbiological investigation of culture negative milk samples of clinical mastitis cows." Milchwissenschaft **65**(2): 123-126.
- Lacasse, P. (2009). Cours sur la biologie de la lactation. PSL705. Session d'automne 2009. Département de Biologie, Université de Sherbrooke.
- Leigh, J. A. (1999). "Streptococcus uberis: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?" Veterinary journal (London, England : 1997) **157**(3): 225-238.
- Longo, M. C., Berninger, M. S. et Hartley, J. L. (1990). "Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions." Gene **93**(1): 125-128.

- Makovec, J. A. et Ruegg, P. L. (2003). "Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001." Journal of dairy science **86**(11): 3466-3472.
- Martin, S. W. (1984). "Estimating disease prevalence and the interpretation of screening." Preventive veterinary medicine **2**(1-4): 463-472.
- Mayrl, E., Roeder, B., Mester, P., Wagner, M. et Rossmanith, P. (2009). "Broad range evaluation of the matrix solubilization (matrix lysis) strategy for direct enumeration of foodborne pathogens by nucleic acids technologies." J Food Prot **72**(6): 1225-1233.
- McDonald, J. S. (1977). "Streptococcal and staphylococcal mastitis." Journal of the American Veterinary Medical Association **170**(10 Pt 2): 1157-1159.
- McKenna, S. L., Keefe, G. P., Barkema, H. W., McClure, J., Vanleeuwen, J. A., Hanna, P. et Sockett, D. C. (2004). "Cow-level prevalence of paratuberculosis in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine." Journal of dairy science **87**(11): 3770-3777.
- Meiri-Bendek, I., Lipkin, E., Friedmann, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S. et Kashi, Y. (2002). "A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk." Journal of dairy science **85**(7): 1717-1723.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. et Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology **51 Pt 1**: 263-273.

- Munoz, M. A., Welcome, F. L., Schukken, Y. H. et Zadoks, R. N. (2007). "Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State." Journal of clinical microbiology **45**(12): 3964-3971.
- National Mastitis Council (2004). Microbiological Procedures for Use in the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. Verona, Wisconsin, NMC.
- NMC (2004). Microbiological Procedures for Use in the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. Verona, Wisconsin, National Mastitis Council.
- Norberg, E. (2005). "Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review." Livestock Production Science **96**(2-3): 129-139.
- Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M. et Mutharia, L. (2001). "Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk." Canadian Journal of Veterinary Research **65**(4): 201-205.
- Olde Riekerink, R. G., Barkema, H. W., Kelton, D. F. et Scholl, D. T. (2008). "Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms." Journal of dairy science **91**(4): 1366-1377.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G. et Magnani, M. (2009). "A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk." Food Microbiol **26**(6): 615-622.

- Oppegaard, H., Steinum, T. M. et Wasteson, Y. (2001). "Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment." Appl Environ Microbiol **67**(8): 3732-3734.
- Osteras, O., Solverod, L. et Reksen, O. (2006). "Milk culture results in a large Norwegian survey--effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering." J Dairy Sci **89**(3): 1010-1023.
- Otto, M. (2004). "Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **9**: 841-863.
- Park, J. Y., Fox, L. K., Seo, K. S., McGuire, M. A., Park, Y. H., Rurangirwa, F. R., Sisco, W. M. et Bohach, G. A. (2010). "Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections." Veterinary microbiology.
- Persson Waller, K., Bengtsson, B., Lindberg, A., Nyman, A. et Ericsson Unnerstad, H. (2009). "Incidence of mastitis and bacterial findings at clinical mastitis in Swedish primiparous cows- influence of breed and stage of lactation." Veterinary microbiology **134**(1-2): 89-94.
- Pfaller, M. A., Acar, J., Jones, R. N., Verhoef, J., Turnidge, J. et Sader, H. S. (2001). "Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **32 Suppl 2**: S156-167.

- Phuektes, P., Mansell, P. D. et Browning, G. F. (2001). "Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus and streptococcal causes of bovine mastitis." Journal of dairy science **84**(5): 1140-1148.
- Piepers, S., De Meulemeester, L., de Kruif, A., Opsomer, G., Barkema, H. W. et De Vlieghe, S. (2007). "Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium." The Journal of dairy research **74**(4): 478-483.
- Piepers, S., Opsomer, G., Barkema, H. W., de Kruif, A. et De Vlieghe, S. (2010). "Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than noninfected heifers." Journal of dairy science **93**(5): 2014-2024.
- Pitcher, D. G. et Nicholas, R. A. (2005). "Mycoplasma host specificity: fact or fiction?" Veterinary journal (London, England : 1997) **170**(3): 300-306.
- Pitkala, A., Haveri, M., Pyorala, S., Myllys, V. et Honkanen-Buzalski, T. (2004). "Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance." J Dairy Sci **87**(8): 2433-2441.
- Podbielski, A., Blankenstein, O. et Lutticken, R. (1994). "Molecular characterization of the cfb gene encoding group B streptococcal CAMP-factor." Medical microbiology and immunology **183**(5): 239-256.
- Podschun, R. et Ullmann, U. (1998). "Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors." Clinical microbiology reviews **11**(4): 589-603.

- Pour Yazdankhah, S., Hellemann, A. L., Rønningen, K. et Olsen, E. (1998). "Rapid and sensitive detection of Staphylococcus species in milk by ELISA based on monodisperse magnetic particles." Veterinary Microbiology **62**(1): 17-26.
- Rappaport, T., Sawyer, K. P. et Nachamkin, I. (1988). "Evaluation of several commercial biochemical and immunologic methods for rapid identification of gram-positive cocci directly from blood cultures." Journal of clinical microbiology **26**(7): 1335-1338.
- Rijpens, N. P., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Rossau, R. et Herman, L. M. (1996). "Direct detection of Brucella spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes." Applied and environmental microbiology **62**(5): 1683-1688.
- Riyaz-Ul-Hassan, S., Syed, S., Johri, S., Verma, V. et Qazi, G. N. (2009). "Application of a multiplex PCR assay for the detection of Shigella, Escherichia coli and Shiga toxin-producing Esch. coli in milk." The Journal of dairy research **76**(2): 188-194.
- Roy, J. P., Du Tremblay, D., DesCoteaux, L., Messier, S., Scholl, D. et Bouchard, E. (2007). "Effect of precalving intramammary treatment with pirlimycin in nulliparous Holstein heifers." Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire **71**(4): 283-291.
- Rupp, R. et Boichard, D. (2003). "Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle." Veterinary research **34**(5): 671-688.
- Sargeant, J. M., Scott, H. M., Leslie, K. E., Ireland, M. J. et Bashiri, A. (1998). "Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and

- bacteriological isolates. [Erratum: Apr 1998, v. 39 (4), p. 240.]" Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne. Jan **39**(1): 33-38.
- Schuchat, A. (1999). "Group B streptococcus." Lancet **353**(9146): 51-56.
- Sundsford, A., Simonsen, G. S., Haldorsen, B. C., Haaheim, H., Hjelmevoll, S. O., Littauer, P. et Dahl, K. H. (2004). "Genetic methods for detection of antimicrobial resistance." APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica **112**(11-12): 815-837.
- Supre, K., De Vlieghe, S., Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., Vaneechoutte, M., Baele, M., De Graef, E., Piepers, S. et Haesebrouck, F. (2009). "Technical note: use of transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative Staphylococcus species originating from bovine milk and teat apices." J Dairy Sci **92**(7): 3204-3210.
- Taponen, S. et Pyorala, S. (2009). "Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from Staphylococcus aureus?" Veterinary microbiology **134**(1-2): 29-36.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T. et Pyorala, S. (2009). "Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing." J Dairy Sci **92**(6): 2610-2617.
- Tenhagen, B. A., Hansen, I., Reinecke, A. et Heuwieser, W. (2009). "Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition." J Dairy Res **76**(2): 179-187.

- Therese, K. L., Anand, A. R. et Madhavan, H. N. (1998). "Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis." The British journal of ophthalmology **82**(9): 1078-1082.
- Thurmond, M. C., Tyler, J. W., Luiz, D. M., Holmberg, C. A. et Picanso, J. P. (1989). "The effect of pre-enrichment on recovery of *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and mycoplasma from bovine milk." Epidemiology and Infection **103**(3): 465-474.
- Tichopad, A., Didier, A. et Pfaffl, M. W. (2004). "Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants." Molecular and Cellular Probes **18**(1):45-50.
- van Weering, H., van Schaik, G., van der Meulen, A., Waal, M., Franken, P. et van Maanen, K. (2007). "Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairy herds." Veterinary microbiology **125**(1-2): 49-58.
- Vary, P. H., Andersen, P. R., Green, E., Hermon-Taylor, J. et McFadden, J. J. (1990). "Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease." Journal of Clinical Microbiology **28**(5): 933-937.
- Versalovic, J. et Lupski, J. R. (2002). "Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers." Trends in microbiology **10**(10 Suppl): S15-21.

- Watts, J. L. (1988). "Characterization and identification of streptococci isolated from bovine mammary glands." Journal of dairy science **71**(6): 1616-1624.
- Weese, J. S. et Prescott, J. F. (2009). "Assessment of laboratory and biosafety practices associated with bacterial culture in veterinary clinics." Journal of the American Veterinary Medical Association **234**(3): 352-358.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. et Lane, D. J. (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study." Journal of bacteriology **173**(2): 697-703.
- Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. et Van Oirschot, J. T. (2002). "Viral infections and bovine mastitis: a review." Veterinary microbiology **88**(1): 27-45.
- Weller, J. I., Saran, A. et Zeliger, Y. (1992). "Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis." Journal of dairy science **75**(9): 2532-2540.
- Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., Ellis, R. P. et Magnuson, R. J. (2006). "Escherichia coli isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity." J Dairy Sci **89**(9): 3408-3412.
- Wielders, C. L., Fluit, A. C., Brisse, S., Verhoef, J. et Schmitz, F. J. (2002). "mecA gene is widely disseminated in Staphylococcus aureus population." Journal of clinical microbiology **40**(11): 3970-3975.
- Wilkinson, H. W. (1977). "CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci." Journal of clinical microbiology **6**(1): 42-45.
- Williams, R. E. (1963). "Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance." Bacteriological reviews **27**: 56-71.

Wilson, K. (2001). "Preparation of genomic DNA from bacteria." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 2**: Unit 2 4.

Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Oliver, S. P. et Schukken, Y. H. (2003). "Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds." Epidemiology and infection **130**(2): 335-349.